

THESIS / THÈSE

DOCTEUR EN SCIENCES

Caractérisation de désaturases et d'élongases impliquées dans le métabolisme lipidique de la perche commune (*Perca fluviatilis*)

Tinti, Emmanuel

Award date:
2019

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



UNIVERSITÉ
DE NAMUR

Faculté des Sciences – Département de Chimie
Unité de Chimie Physique Théorique et Structurale
Laboratoire de Chimie Physique des Biomolécules

Caractérisation de désaturases et d'élongases
impliquées dans le métabolisme lipidique
de la perche commune (*Perca fluviatilis*)

Thèse présentée par
Emmanuel TINTI
pour l'obtention du grade de
Docteur en Sciences





Faculté des Sciences – Département de Chimie
Unité de Chimie Physique Théorique et Structurale
Laboratoire de Chimie Physique des Biomolécules

**Caractérisation de désaturases et d'élongases
impliquées dans le métabolisme lipidique
de la perche commune (*Perca fluviatilis*)**

Thèse présentée par
Emmanuel TINTI
pour l'obtention du grade de
Docteur en Sciences

Composition du Jury :

- 1 – Carlos Alemán (Université Polytechnique de Catalogne)
- 2 – Frédéric Francis (Gembloux Agro-Bio Tech, ULiège)
- 3 – Patrick Kestemont (UNamur, co-promoteur)
- 4 – Catherine Michaux (UNamur)
- 5 – Éric A. Perpète (UNamur, secrétaire et promoteur)
- 6 – Frédéric Silvestre (UNamur, président)

« Tout ce que nous avons à décider, c'est ce que nous devons faire du temps qui nous est donné. »

Gandalf, en l'an 3018 du Troisième Âge selon le comput de la Terre du Milieu.

Remerciements

Cette dissertation originale n'aurait pu voir le jour sans le concours de toute une série d'acteurs. Mes remerciements vont donc à :

- Éric A. Perpète et Patrick Kestemont, sans qui le projet à l'origine de ce travail de longue haleine n'aurait jamais été écrit (et même s'il n'a pas permis au premier cité d'assouvir sa plus grande ambition et d'enfin devenir directeur de l'UCPTS) ;
- The Old Crust, sans qui la mise en œuvre pratique n'aurait été possible (exception faite des désormais célèbres épisodes intitulés « Un burger à la Mitre » et « Les méluriens et la gravité penchée ») ;
- Frédéric Wautelet, sans qui Rosetta ne serait resté qu'un vague concept théorique ;
- Guillaume Roussel, sans qui les portes du laboratoire CPB n'auraient jamais été franchies ;
- l'Union Raisonnable des Biologistes Éclairés, pour avoir occupé les temps de midi de la saison 1 ;
- l'Amicale de Belote Chimique (qu'ils soient Chimiste Portugais et Bonimenteur, Chimiste Bayard et Principautaire, Chimay Poiluchette et Bush, Chimiste Branquignole et Sulfureux, Chimistes Excentriques et Saugrenus, ou encore Chimiste Organicien Marmouset et Schizophrène) pour avoir occupé les temps de midi de la saison 2 ;
- le relecteur officiel de la présente, pour lui avoir donné ses deux versions finales (la provisoire et la définitive) ;
- et, finalement, tous ceux qui n'auraient pas été cités, connus et/ou inconnus.

Sommaire

Remerciements.....	vii
Sommaire.....	ix
Table des abréviations utilisées.....	xi
Table des espèces citées.....	xiii
Chapitre 1 – Mise en contexte.....	1
Chapitre 2 – Objectif & stratégie.....	37
Chapitre 3 – Isolation et identification des séquences nucléotidique et peptidique des protéines d'intérêt.....	39
Chapitre 4 – Modélisation de la structure tridimensionnelle des protéines d'intérêt.....	51
Chapitre 5 – Conclusions et mise en perspective.....	81
Annexes.....	85

Table des abréviations utilisées

Abréviation	Signification
AA	Acide arachidonique (C20:4 Δ 5,8,11,14)
ACP	Acyl carrier protein
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ALA	Acide α -linoléique (C18:3 Δ 9,12,15)
ARN	Acide ribonucléique
ARN_T	ARN totaux
CÉCI	Consortium des Équipements de Calcul Intensif
CER	Elongase du système KCS (β -cétoacyl-CoA synthase)
CoA	Coenzyme A
Cx:yn-z/ωz	Acide gras à x carbones comprenant y doubles liaisons dont la dernière se trouve à z carbones de l'extrémité méthyl-terminale
Cx:yΔz₁,...,z_y	Acide gras à x carbones comprenant y doubles liaisons dont la première se trouve à z carbones de l'extrémité carboxyl-terminale
Cyt b₅	Cytochrome b ₅
Des/Elo	Système désaturases/élongases
DGLA	Acide dihomog γ -linoléique (C20:3 Δ 8,11,14)
DH/2,2I	Déshydratase/trans-2,cis-2 isomérase
DH/2,3I	Déshydratase/trans-2,cis-3 isomérase
DHA	Acide docosahexaénoïque ou cervonique (22:6 Δ 4,7,10,13,16,19)
EFA	Acide gras essentiel
ELO	Elongase du système ELO
ELOVL	Elongase du système ELO
EPA	Acide eicosapentaénoïque ou timnodonique (C20:5 Δ 8,11,14,17)
ER	β -énoyl réductase
FAD	Désaturase d'acides gras
FADH₂	Flavine adénine dinucléotide
FAE	Elongase du système KCS (β -cétoacyl-CoA synthase)
FAS	Acides gras synthase
FED	Désaturases de type « front-end »
FL-PCR	Amplification de la longueur totale de l'ADNc par PCR
GLA	Acide γ -linoléique (C18:3 Δ 6,9,12)
GPCR	Récepteur couplé à une protéine G
HD	β -hydroxyacyl déshydratase
HUFA	Acide gras polyinsaturé à chaîne longue (C20-C24) ; synonyme de LC-PUFA
KAS	β -cétoacyl-ACP synthase
KR	β -cétoacyl réductase
KS	β -cétoacyl synthase
LA	Acide linoléique (C18:2 Δ 9,12)
LC-PUFA	Acide gras polyinsaturé à chaîne longue (C20-C24) ; synonyme de HUFA
LC-SFA	Acide gras saturé à chaîne courte (C14-C24)
MAT	Malonyl-CoA/acetyl-CoA:ACP transacylase
MC-SFA	Acide gras saturé à chaîne moyenne (C6-C12)
MD	Dynamique moléculaire
MED	Désaturases de type « methyl-end »

MUFA	Acide gras monoinsaturé (C14-C24)
MW	Masse moléculaire
n-z	Série d'acides gras caractérisée par l'emplacement de sa dernière double liaison (à z carbones de l'extrémité méthyl-terminale) ; synonyme de ωz
NAD(P)H	Nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate)
NMR	Résonance magnétique nucléaire
OLA	Acide oléique (C18:1 Δ 9)
ORF	Cadre de lecture ouvert
PA	Acide palmitique (C16:0)
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PCR	Réaction en chaîne par polymérase
pI	Point isoélectrique
PKS	Polycétide synthase
POA	Acides palmitoléique (C16:1 Δ 9)
PTCI	Plateforme technologique de calcul intensif
PUFA	Acide gras polyinsaturé
RACE-PCR	Amplification rapide d'extrémités d'ADNc par PCR
RE(L)	Réticulum endoplasmique (lisse)
RMSD	Déviation de la racine de la moyenne des carrés
RMSF	Fluctuation de la racine de la moyenne des carrés
SA	Acide stéarique (C18:0)
SC-PUFA	Acide gras polyinsaturé à chaîne courte (C14-C18)
SC-SFA	Acide gras saturé à chaîne courte (C1-C4)
SCD	Stéaroyl-CoA désaturase
SFA	Acide gras saturé
SLPC	1-stéaroyl-2-linoléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine
STA	Acide stéaridonique (C18:4 Δ 6,9,12,15)
TE	Acyl-ACP thioesterase
TMBB	Tonneau β transmembranaire
TMH	Hélice α transmembranaire
UTR	Extrémité non traduite, soit 5'-UTR soit 3'-UTR
VLC-PUFA	Acide gras polyinsaturé à chaîne très longue (> C24)
XRD	Diffraction de rayons X
Δx	Activité de désaturation portant sur les carbones carboxyl-terminaux x et x+1
Δx-Y-ACP-DES	Acyl-ACP désaturase dont l'activité porte sur les carbones carboxyl-terminaux x et x+1 de l'acide gras Y
ΔxD	Désaturase dont l'activité porte sur les carbones carboxyl-terminaux x et x+1
$\Delta x\Delta yD$	Désaturase bifonctionnelle réalisant les activités de désaturation Δx et Δy
$\omega y/\Delta z$	Activité de désaturation portant sur les carbones méthyl-terminaux y et y+1 et carboxyl-terminaux z et z+1
$\omega y/\Delta zD$	Désaturase dont l'activité porte sur les carbones méthyl-terminaux y et y+1 et carboxyl-terminaux z et z+1
ωz	Série d'acides gras caractérisée par l'emplacement de sa dernière double liaison (à z carbones de l'extrémité méthyl-terminale) ; synonyme de n-z

Table des espèces citées

Nom scientifique*	Nom français	Nom anglais	Classification**
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	/	/	Protiste
<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	Pagre tête noire	Blackhead seabream	Poisson
<i>Acetes japonicus</i>	Crevette akiami	Akiami paste shrimp	Invertébré
<i>Acheta domesticus</i>	Grillon domestique	House cricket	Invertébré
<i>Anemone leveillei</i>	Anémone	Anemone	Plante
<i>Anguilla japonica</i>	Anguille du Japon	Japanese eel	Poisson
<i>Anolis carolinensis</i>	Anole vert	Carolina anole	Vertébré
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Arabette des dames	Thale cress	Plante
<i>Arapaima gigas</i>	Pirarucu	Pirarucu	Poisson
<i>Argyrosomus regius</i>	Maigre	Meagre	Poisson
<i>Asclepias syriaca</i>	Asclépiade commune	Milkweed	Plante
<i>Borago officinalis</i>	Bourrache officinale	Borage	Plante
<i>Bos taurus</i>	Vache	Cattle	Vertébré
<i>Brassica carinata</i>	Moutarde d'Abyssinie	Abyssinian mustard	Plante
<i>Brassica juncea</i>	Moutarde brune	Brown mustard	Plante
<i>Brassica napus</i>	Colza	Rapeseed	Plante
<i>Brevoortia patronus</i>	Menhaden écailleux	Gulf menhaden	Poisson
<i>Caenorhabditis elegans</i>	/	/	Invertébré
<i>Calanus hyperboreus</i>	/	/	Invertébré
<i>Camelina sativa</i>	Cameline	Camelina	Plante
<i>Ceratodon purpureus</i>	/	Fire moss	Plante inférieure
<i>Channa striata</i>	Poisson tête-de-serpent	Striped snakehead	Poisson
<i>Chanos chanos</i>	Chanos	Milkfish	Poisson
<i>Chirostoma estor</i>	/	Pike silverside	Poisson
<i>Choristoneura rosaceana</i>	Tordeuse à bandes obliques	Obliquebanded leafroller moth	Invertébré
<i>Ciona intestinalis</i>	Cione	Sea squirt	Invertébré
<i>Clarias gariepinus</i>	Poisson-chat africain	African sharptooth catfish	Poisson
<i>Claviceps purpurea</i>	Ergot du seigle	Rye ergot	Champignon
<i>Clupea harengus</i>	Hareng de l'Atlantique	Atlantic herring	Poisson
<i>Coregonus laveratus</i>	Lavaret	Whitefish	Poisson
<i>Coriandrum sativum</i>	Coriandre cultivée	Coriander	Plante
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	Carpe chinoise	Grass carp	Poisson
<i>Cucumis sativus</i>	Concombre	Cucumber	Plante
<i>Cyprinus carpio</i>	Carpe commune	Common carp	Poisson
<i>Danio rerio</i>	Poisson-zèbre	Zebrafish	Poisson

<i>Decapterus spp.</i>	Comètes	Scads	Poisson
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>	/	/	Bactérie
<i>Dicentrarchus labrax</i>	Bar commun	European sea bass	Poisson
<i>Dictyostelium discoideum</i>	Amibe sociale	Slime mold	Protiste
<i>Dosidicus gigas</i>	Encornet géant	Jumbo flying squid	Invertébré
<i>Doxantha unguis-cati</i>	Grif à chat	Cat's claw	Plante
<i>Drosophila melanogaster</i>	Mouche du vinaigre	Common fruit fly	Invertébré
<i>Engraulis japonicus</i>	Anchois japonais	Japanese anchovy	Poisson
<i>Engraulis ringens</i>	Anchois péruvien	Peruvian anchovy	Poisson
<i>Epinephelus coioides</i>	Mérou à taches oranges	Orange-spotted grouper	Poisson
<i>Epiphyas postvittana</i>	« LBAM »	Light brown apple moth	Invertébré
<i>Escherichia coli</i>	/	/	Bactérie
<i>Esox lucius</i>	Brochet	Northern pike	Poisson
<i>Euglena gracilis</i>	/	/	Protiste
<i>Gadus morhua</i>	Morue de l'Atlantique	Atlantic cod	Poisson
<i>Gallus gallus</i>	Coq bankiva	Red junglefowl	Vertébré
<i>Glycine max</i>	Soja	Soybean	Plante
<i>Glossomastix chrysoplata</i>	/	/	Protiste
<i>Hedera helix</i>	Lierre grimpant	English Ivy	Plante
<i>Homo sapiens</i>	Homme moderne	Human	Vertébré
<i>Ictalurus furcatus</i>	Poisson-chat bleu	Blue catfish	Poisson
<i>Ictalurus punctatus</i>	Barbue de rivière	Channel catfish	Poisson
<i>Isochrysis galbana</i>	/	/	Protiste
<i>Katsuwonus pelamis</i>	Bonite à ventre rayé	Skipjack tuna	Poisson
<i>Kluyveromyces lactis</i>	/	/	Champignon
<i>Larimichthys crocea</i>	Tambour à gros yeux	Large yellow croaker	Poisson
<i>Lates calcarifer</i>	Barramundi	Asian sea bass	Poisson
<i>Limnathes alba</i>	/	White meadowfoam	Plante
<i>Micromesistius poutassou</i>	Merlan bleu	Blue whiting	Poisson
<i>Moritella marina</i>	/	/	Bactérie
<i>Mortierella alpina</i>	/	/	Champignon
<i>Mucor rouxii</i>	/	/	Champignon
<i>Mus musculus</i>	Souris grise	House mouse	Vertébré
<i>Nemipterus spp.</i>	Cohanas	Threadfin breams	Poissons
<i>Nibe mitsukurii</i>	Corvina honnibe	Nibe croaker	Poisson
<i>Oenothera spp.</i>	Oenothères	Evening primroses	Plantes
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Truite arc-en-ciel	Rainbow trout	Poisson
<i>Oncorhynchus keta</i>	Saumon du Pacifique	Chum salmon	Poisson
<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Saumon coho	Coho salmon	Poisson
<i>Oncorhynchus masou</i>	Saumon du Japon	Cherry salmon	Poisson
<i>Oreochromis niloticus</i>	Tilapia du Nil	Nile tilapia	Poisson
<i>Oreochromis zilli</i>	Tilapia zilli	Redbelly tilapia	Poisson

<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Lapin de garenne	European rabbit	Vertébré
<i>Oryzias latipes</i>	Médaka	Japanese ricefish	Poisson
<i>Ostreococcus tauri</i>	/	/	Plante inférieure
<i>Ostrinia</i> spp.	Pyrales	Corn borers	Invertébré
<i>Pagrus major</i>	Dorade japonaise	Red sea bream	Poisson
<i>Papio anubis</i>	Babouin olive	Olive baboon	Vertébré
<i>Paralichthys olivaceus</i>	Cardeau hirame	Japanese flounder	Poisson
<i>Pavlova salina</i>	/	/	Protiste
<i>Pelargonium xhortorum</i>	Géranium	Geranium	Plante
<i>Perca fluviatilis</i>	Perche commune	European perch	Poisson
<i>Periplaneta americana</i>	Blatte américaine	American cockroach	Invertébré
<i>Perkinsus marinus</i>	/	/	Protiste
<i>Photobacterium profundum</i>	/	/	Bactérie
<i>Physcomitrella patens</i>	/	Spreading earthmoss	Plante inférieure
<i>Phytophthora infestans</i>	Mildiou de la pomme de terre	Late potato blight	Protiste
<i>Plecoglossus altivelis</i>	Ayu	Ayu	Poisson
<i>Pleuronectes ferrugineus</i>	Limande jaune	Yellowtail flounder	Poisson
<i>Portunus trituberculatus</i>	Crabe bleu japonais	Gazami crab	Invertébré
<i>Primula</i> spp.	Primevères	Primroses	Plantes
<i>Psetta maxima</i>	Turbot	Turbot	Poisson
<i>Pseudocaranx dentex</i>	Carangue dentue	Striped jack	Poisson
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	/	/	Bactérie
<i>Pythium irregulare</i>	/	/	Protiste
<i>Rachycentron canadum</i>	Cobia	Cobia	Poisson
<i>Rastrelliger kanagurta</i>	Maquereau des Indes	Indian mackerel	Poisson
<i>Rattus norvegicus</i>	Rat brun	Brown rat	Vertébré
<i>Rhabdosargus sarba</i>	Sargue doré	Silver bream	Poisson
<i>Ribes nigrum</i>	Cassissier	Blackcurrant	Plante
<i>Ricinus communis</i>	Ricin commun	Castorbean	Plante
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Levure de boulanger	Baker's yeast	Champignon
<i>Saccharomyces kluyveri</i>	/	/	Champignon
<i>Salmo salar</i>	Saumon atlantique	Atlantic salmon	Poisson
<i>Salvelinus alpinus</i>	Omble chevalier	Arctic charr	Poisson
<i>Saprolegnia diclina</i>	/	/	Protiste
<i>Sardina pilchardus</i>	Sardine commune	European pilchard	Poisson
<i>Sardinella</i> spp.	Sardinelles	Sardinellas	Poisson
<i>Sardinops melanostictus</i>	Pilchard du Japon	Japanese pilchard	Poisson
<i>Schizochytrium</i> spp.	/	/	Protiste
<i>Sciaenops ocellatus</i>	Ombrine ocellée	Red drum	Poisson

<i>Scomber colias</i>	Maquereau blanc	Atlantic chub mackerel	Poisson
<i>Scomber japonicus</i>	Maquereau espagnol	Chub mackerel	Poisson
<i>Scomber scombrus</i>	Maquereau commun	Atlantic mackerel	Poisson
<i>Scomberomorus spp.</i>	Thazards	Seerfish	Poisson
<i>Scophthalmus maximus</i>	Turbot	Turbot	Poisson
<i>Scyliorhinus canicula</i>	Petite roussette	Small-spotted catshark	Vertébré
<i>Sebastes schlegelii</i>	Sébaste de Corée	Korean rockfish	Poisson
<i>Shewanella spp.</i>	/	/	Bactérie
<i>Siganus canaliculatus</i>	Sigan pintade	White-spotted spinefoot	Poisson
<i>Silurus glanis</i>	Silure glane	Sheatfish	Poisson
<i>Siniperca chuatsi</i>	Poisson mandarin	Mandarin fish	Poisson
<i>Solea senegalensis</i>	Sole du Sénégal	Senegalese sole	Poisson
<i>Sparus aurata</i>	Daurade royale	Gilthead sea bream	Poisson
<i>Spirulina platensis</i>	/	/	Cyanobactérie
<i>Spodoptera littoralis</i>	Noctuelle méditerranéenne	Mediterranean brocade	Invertébré
<i>Sprattus sprattus</i>	Anchois de Norvège	European sprat	Poisson
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	/	/	Bactérie
<i>Takifugu rubripes</i>	/	Japanese pufferfish	Poisson
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	/	/	Protiste
<i>Theragra chalcogramma</i>	Colin d'Alaska	Alaska pollock	Poisson
<i>Thermus thermophilus</i>	/	/	Bactérie
<i>Thraustochytrium spp.</i>	/	/	Protiste
<i>Thunbergia alata</i>	Suzanne aux yeux noirs	Black-eyed susan vine	Plante
<i>Thunnus albacares</i>	Thon jaune	Yellowfin thuna	Poisson
<i>Thunnus maccoyii</i>	Thon rouge du Sud	Southern bluefin tuna	Poisson
<i>Thunnus thynnus</i>	Thon rouge de l'Atlantique	Atlantic bluefin tuna	Poisson
<i>Trachurus spp.</i>	Chinchard	Mackerels	Poisson
<i>Trichiurus lepturus</i>	Poisson-sabre commun	Largehead hairtail	Poisson
<i>Trypanosoma brucei</i>	/	/	Protiste
<i>Vibrio marinus</i>	/	/	Bactérie
<i>Xenopus laevis</i>	Xénope du Cap	African clawed frog	Vertébré
<i>Xenopus tropicalis</i>	/	Western clawed frog	Vertébré

* Les organismes sont renseignés suivant la nomenclature binomiale genre-espèce utilisée dans le manuscrit. Dans le cas où seul le genre est spécifié, il est alors suivi des mentions « sp. » ou « spp. » en fonction de l'utilisation qui en est faite : « sp. » lorsque le genre dans son ensemble est visé, « spp. » lorsque la mention rassemble plusieurs espèces (non citées) du genre considéré.

** L'objet du présent travail ne portant pas sur la systématique des êtres vivants, le système de classification utilisé dans cette table, dans le corps du texte et dans les pieds de page du manuscrit permet de s'affranchir de la phylogénie et de faire usage de dénominations taxonomiques « pratiques ». Afin de lever toute ambiguïté sur la signification exacte des termes, leur acception est explicitée ci-dessous.

- Procaryotes : bactéries, y compris cyanobactéries.
- Eucaryotes : tous les organismes vivants à l'exclusion des bactéries.
- Protistes : tous les eucaryotes à l'exclusion des plantes, champignons et animaux.
- Plantes : toutes les espèces appartenant au règne des *Plantae*, plantes inférieures et supérieures.
- Plantes inférieures : toutes les plantes à l'exclusion des conifères et plantes à fleurs.
- Plantes supérieures : conifères et plantes à fleurs.
- Champignon : toutes les espèces appartenant au règne des *Fungi*.
- Animaux : toutes les espèces appartenant au règne des *Animalia*, invertébrés et vertébrés.
- Invertébrés : tous les animaux à l'exclusion des poissons, amphibiens, reptiles, oiseaux et mammifères.
- Vertébrés : poissons, amphibiens, reptiles, oiseaux et mammifères.
- Poissons : comprenant les poissons sans mâchoire, poissons cartilagineux et poissons osseux.

Dans le cas précis où un terme spécifique serait utilisé pour désigner un groupe particulier d'espèces, son acception serait celui de la systématique moderne.

CHAPITRE 1

Chapitre 1 – Mise en contexte

1.	L'AQUACULTURE COMME RESSOURCE ALIMENTAIRE	2
1.1.	Nourrir l'humanité	2
1.2.	Surpêche et essor de l'aquaculture	2
1.3.	Développement et contraintes de l'aquaculture.....	4
1.4.	Alternatives aux huiles de poissons	5
2.	<i>PERCA FLUVIATILIS</i> COMME ORGANISME MODELE.....	6
3.	LES ACIDES GRAS COMME BASE D'ETUDE	8
3.1.	Les acides gras sont des lipides	8
3.2.	Nomenclature et structure des acides gras	9
3.3.	Fonctions des acides gras	11
4.	LES ENZYMES DU METABOLISME LIPIDIQUE COMME THEME D'ETUDE	12
4.1.	Biosynthèse des acides gras	12
4.1.1.	Lipogenèse.....	12
4.1.2.	Synthèse des SFA.....	12
4.1.3.	Synthèse des MUFA	12
4.1.4.	Synthèse des PUFA/HUFA.....	12
4.2.	Acteurs enzymatiques des voies de synthèse des acides gras	14
4.2.1.	Acteurs multiples, systèmes multiples	14
4.2.2.	Système Des/Elo.....	14
4.2.3.	Besoins alimentaires en acides gras essentiels	16
4.3.	Désaturases d'acides gras	18
4.3.1.	Classification des FAD.....	18
4.3.2.	Origine et diversité des FAD.....	19
4.3.3.	Caractéristiques structurales et fonctionnelles des FED.....	21
4.3.4.	FED chez les poissons	21
4.4.	Elongases d'acides gras à longue chaîne	22
4.4.1.	Systèmes d'élongation.....	22
4.4.2.	Origine et diversité des ELO(VL).....	23
4.4.1.	Caractéristiques structurales et fonctionnelles des ELO(VL).....	24
4.4.2.	ELOVL chez les poissons.....	25
5.	LA SYNTHÈSE DES ACIDES GRAS DANS LE SYSTÈME DESATURASES/ELONGASES COMME SUJET D'ETUDE.....	25
6.	BIBLIOGRAPHIE	26
7.	WEBOGRAPHIE	35

1. L'aquaculture comme ressource alimentaire

1.1. Nourrir l'humanité

Un des défis majeurs de notre société est – et sera – l'**approvisionnement des populations humaines en ressources alimentaires** [1]. En effet, l'accroissement démographique continu (Figure 1-1) engendrera une augmentation de la demande en nourriture sans cesse plus grande pour au moins les quarante prochaines années [2]. Dès lors, une plus grande compétition pour les terres, l'eau et l'énergie affectera substantiellement notre capacité de production de nourriture et conduira nécessairement à un besoin urgent de réduire son impact sur l'environnement [3].

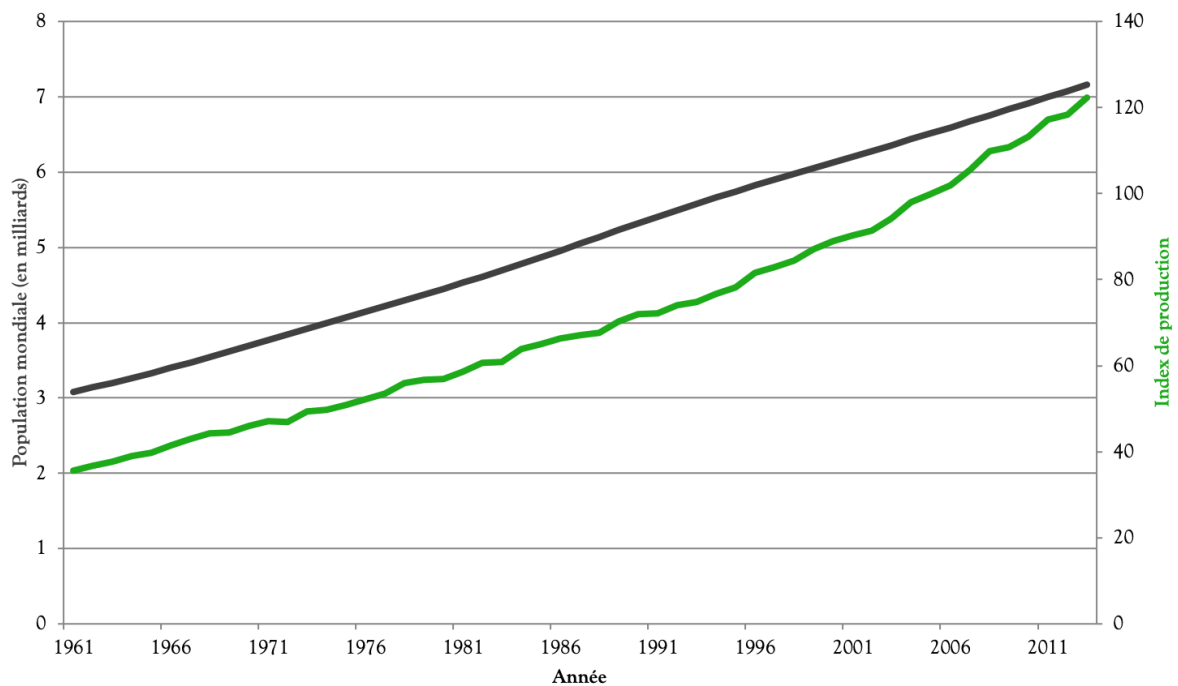


Figure 1-1. Accroissement démographique et production alimentaire au niveau mondial (<http://faostat3.fao.org>).

Par le passé, les populations humaines répondaient aux menaces de pénurie alimentaire par l'allocation de plus de terres aux activités agricoles et par l'exploitation de nouveaux stocks cynégétiques et halieutiques¹ [3]. Ces mesures, relativement efficaces à court terme pour des populations isolées de taille modeste, sont désormais inapplicables, tant au regard de la globalisation que de la démographie (actuellement 7,6 milliards d'êtres humains, probablement 9,6 milliards en 2050) [4].

1.2. Surpêche et essor de l'aquaculture

Depuis toujours, les populations humaines ont pratiqué la pêche qui, jusque dans la deuxième moitié du siècle dernier, se limitait à une récolte du « surplus » produit par les eaux douces et les océans. Lorsque ces « surplus » furent épuisés (spécifiquement, spatialement, ...), les « stocks » furent entamés. Ce qui n'a pas été sans conséquences : actuellement, près de 60 %

¹ Respectivement issus de la chasse et de la pêche.

des espèces marines sont pleinement exploitées, plus de 30 % surexploitées, et seulement moins de 10 % sous-exploitées (Figure 1-2) [5,6].

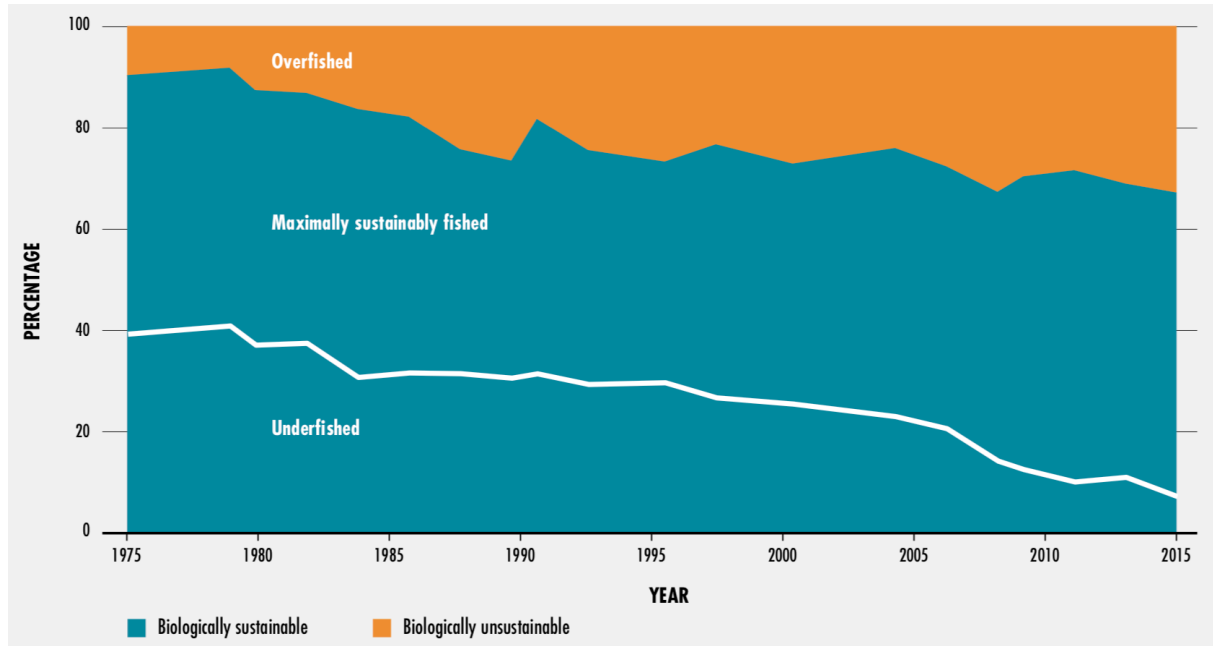


Figure 1-2. Evolution globale des stocks de poissons marins entre 1975 et 2015 [7].

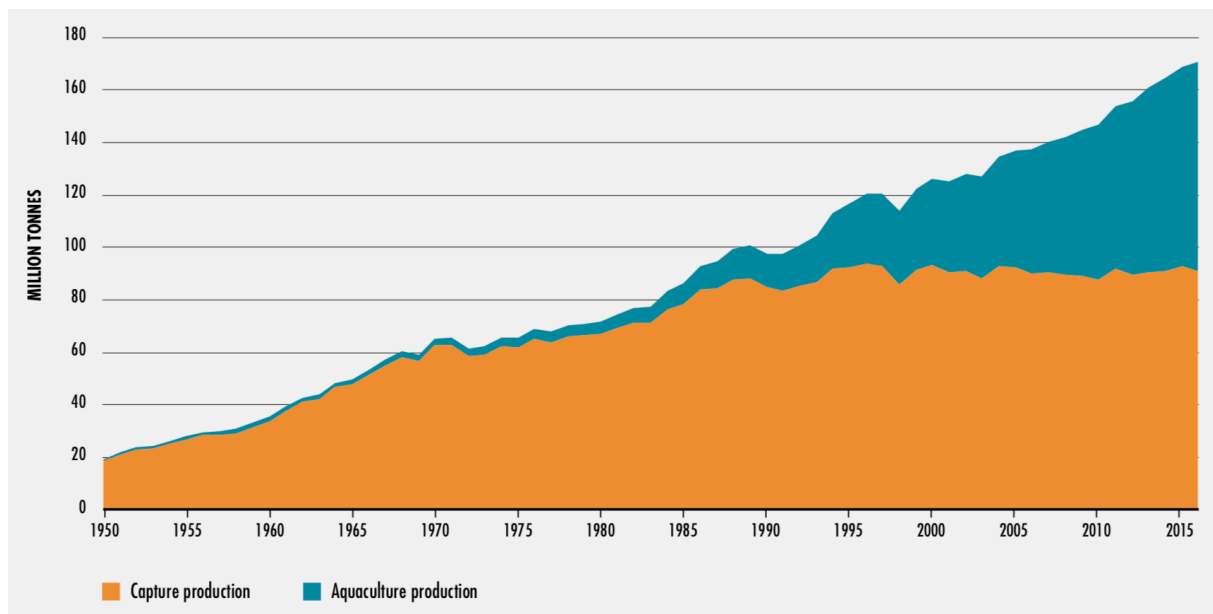


Figure 1-3. Production mondiale de la pêche et de l'aquaculture entre 1950 et 2015 [7].

La surexploitation des stocks pose de nombreux problèmes environnementaux, dont une perte de biodiversité entraînant la perturbation des réseaux trophiques² [8,9]. Néanmoins, renoncer aux produits halieutiques n'est actuellement pas à l'ordre du jour. En effet, 150 g de poisson fournissent entre 50 et 60 % des besoins protéiques journaliers d'un adulte. Plus globalement, les poissons et les invertébrés marins représentent 16,7 % de l'apport en protéines animales au niveau mondial (6,5 % des protéines totales). Cette proportion peut monter à 20 % dans les pays densément peuplés et sous-développés (2,9 milliards de personnes) [5]. De

² Ensemble des chaînes alimentaires d'un écosystème.

plus, ils constituent la principale source d'acides gras essentiels (EFA) de type « $\omega 3$ » de notre alimentation [10].

L'aquaculture s'est donc développée de manière accélérée afin de compenser d'une part la lenteur du renouvellement des stocks et d'autre part l'augmentation de la demande en produits halieutiques. Actuellement, l'aquaculture fournit près de la moitié de ces produits à destination de l'alimentation humaine (Figure 1-3) [11].

1.3. Développement et contraintes de l'aquaculture

L'aquaculture, en tant qu'alternative à la pêche, tente de découpler la production d'organismes aquatiques des fluctuations environnementales en contrôlant la croissance, la nutrition et les maladies [12].

Tableau 1-1. Principales espèces de poissons-fourrages exploitées parmi les 25 espèces les plus pêchées [7].

Rang	Espèces et genres prélevés		Quantité pêchée (t/an)
1	<i>Theragra chalcogramma</i>	Colin d'Alaska	3500000
2	<i>Engraulis ringens*</i>	Anchois péruvien	3200000
3	<i>Katsuwonus pelamis</i>	Bonite à ventre rayé	2800000
4	<i>Sardinella spp.</i>	Sardinelles	2300000
5	<i>Trachurus spp.</i>	Chinchards	1700000
6	<i>Clupea harengus</i>	Hareng de l'Atlantique	1600000
7	<i>Scomber japonicus</i>	Maquereau espagnol	1600000
8	<i>Thunnus albacares</i>	Thon jaune	1500000
9	<i>Gadus morhua</i>	Morue de l'Atlantique	1300000
10	<i>Engraulis japonicus</i>	Anchois japonais	1300000
11	<i>Sardina pilchardus</i>	Sardine commune	1300000
12	<i>Trichiurus lepturus</i>	Poisson-sabre commun	1300000
13	<i>Decapterus spp.</i>	Comètes	1300000
14	<i>Micromesistius poutassou</i>	Merlan bleu	1200000
15	<i>Scomber scombrus</i>	Maquereau commun	1100000
16	<i>Scomberomorus spp.</i>	Thazards	900000
17	<i>Dosidicus gigas</i>	Encornet géant	700000
18	<i>Nemipterus spp.</i>	Cohanas	700000
19	<i>Brevoortia patronus</i>	Menhaden écailleux	600000
20	<i>Sprattus sprattus</i>	Anchois de Norvège	600000
21	<i>Portunus trituberculatus</i>	Crabe bleu japonais	600000
22	<i>Acetes japonicus</i>	Crevette akiami	500000
23	<i>Sardinops melanostictus</i>	Pilchard du Japon	500000
24	<i>Scomber colias</i>	Maquereau blanc	500000
25	<i>Rastrelliger kanagurta</i>	Maquereau des Indes	500000
Total des 25 premiers rangs			33000000
Total mondial			79000000
Importance des 25 premiers rangs sur l'ensemble des captures (%)			41,9

* Les espèces utilisées comme poissons-fourrages sont colorées en vert.

Concernant la nutrition, l'élevage de poissons carnivores (surtout marins) occupant un niveau trophique élevé requiert l'utilisation de farines et d'huiles de poissons dit « fourrages » [13]. Entre un quart et un tiers des captures mondiales (20-30 millions de tonnes) est utilisé chaque année pour produire ces aliments à destination principalement de l'élevage animal (dont 56 % des farines et 87 % des huiles en aquaculture) (Tableau 1-1). Dans les réseaux trophiques naturels, ces poissons-fourrages jouent un rôle important en convertissant le plancton en nourriture pour les espèces occupant un niveau trophique³ plus élevé (grands poissons, oiseaux de mer, mammifères marins, hommes) [11]. Ainsi, la salmoniculture et la pénéculture⁴ sont des consommateurs nets de poissons-fourrages, requérant 3 kg de ceux-ci pour produire 1 kg d'animaux. Cependant, ces espèces ne représentent qu'une petite part de l'aquaculture. Si on considère cette dernière de manière globale, elle correspond à une production nette de nourriture : 3,5-4 kg de nourriture par kilogramme de poissons-fourrages [14].

Néanmoins, en Europe occidentale et en Amérique, où la principale production résulte de l'élevage de salmonidés et de poissons marins, l'aquaculture poursuit plus un objectif de rentabilité que de durabilité : convertir des farines et huiles de poissons de relativement faible valeur nutritive en produits alimentaires à haute valeur ajoutée pour le marché humain [15].

L'actuelle dépendance de la salmoniculture et de la mariculture⁵ à ces farines et huiles de poissons est un problème fondamental en aquaculture en tant qu'alternative à la pêche, et elle nécessite donc des solutions de substitution [16].

1.4. Alternatives aux huiles de poissons

Les poissons constituent pour les humains la source majeure en acides gras essentiels de type « $\omega 3$ ». La plupart des espèces marines, qui représentent par ailleurs les principaux produits de l'aquaculture européenne et américaine avec les salmonidés, sont généralement carnivores et ces acides gras sont des nutriments essentiels qu'elles prélèvent de leurs proies (autres poissons, invertébrés) ; d'où l'utilisation de farines et huiles de poisson dans la mariculture (et la salmoniculture) [10]. Les stocks de poissons-fourrages étant actuellement surexploités, il apparaît nécessaire de trouver des alternatives à l'utilisation de ces farines et huiles, tant d'un point de vue durabilité que d'un point de vue croissance des activités aquacoles.

Une de ces alternatives consiste à remplacer les huiles animales par des huiles végétales, comme celles issues du tournesol, du lin, du colza, du soja, de l'olive ou encore de la palme [17]. Cependant, quatre constats pourraient freiner la mise en application de cette alternative :

- les végétaux sont dépourvus des acides gras que les poissons recherchent dans leur nourriture (en revanche, ils sont riches en leurs précurseurs) (Tableau 1-2) [18] ;
- la capacité des poissons à synthétiser ces acides gras à partir de leurs précurseurs varie parmi les espèces en fonction du régime alimentaire (herbivore/omnivore *versus* carnivore) et de l'habitat (dulcicole⁶ *versus* marin) [19] ;
- les voies de synthèse de ces acides gras sont encore mal connues et les acteurs enzymatiques mal identifiés [20] ;

³ Rang occupé par un organisme dans un réseau trophique.

⁴ Respectivement élevage de salmonidés (diverses espèces de saumons et de truites) et de crevettes.

⁵ Elevage d'organismes marins.

⁶ D'eau douce.

- la modification de la composition en acides gras de la chair de poisson⁷ suite au remplacement des huiles animales par des huiles végétales peut impacter de manière négative l'intérêt de ces organismes dans l'alimentation humaine [21,22].

Tableau 1-2. Composition en acides gras d'huiles et de graisses commercialement disponibles [23].

	Palme	Colza	Soja	Olive	Lin	Saïndoux	Hareng	Anchois
Production mondiale^a	17,1	11,4	20,8	2	0,7	6,1	1,4	1,4
16:0	61 ^b	5	11	14	7	26	13	17
16:1n-7	traces	traces	traces	2	traces	3	7	9
18:0	5	2	4	3	5	15	1	4
18:1n-9	26	60	22	69	18	49	10	12
18:2n-6	7	21	54	12	17	9	1	1
18:3n-3	traces	10	8	1	54	traces	1	1
20:5n-3	0	0	0	0	0	0	6	17
22:6n-3	0	0	0	0	0	0	6	9

^a En millions de tonnes et pour l'année 1996

^b En % du poids total en acides gras

Dans ce contexte, il est essentiel de comprendre le mécanisme d'action des enzymes impliquées dans le métabolisme lipidique des poissons et plus particulièrement pour les espèces d'intérêt aquacole.

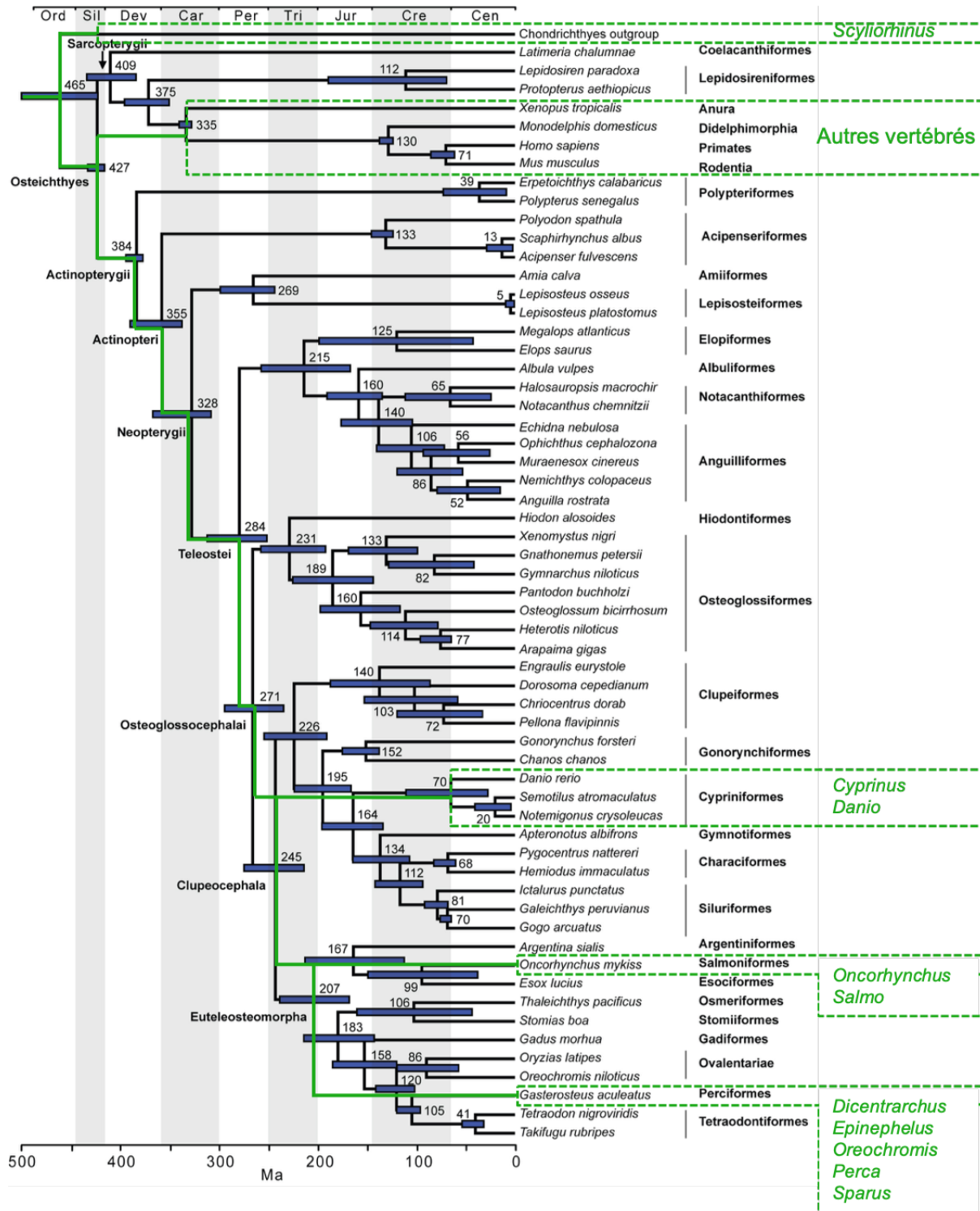
2. *Perca fluviatilis* comme organisme modèle

La perche commune (*Perca fluviatilis* L., 1758) est un Perciforme carnivore d'eau douce largement distribué en Eurasie (Figures 1-4, 1-5 & 1-6 ; Tableau 1-3). Etant un des rares membres dulcicoles de cet ordre presque exclusivement marin, l'investigation du métabolisme des lipides chez cette espèce revêt un intérêt tout particulier. En effet, sa capacité supposée à synthétiser les acides gras essentiels d'intérêt nutritif à partir de leurs précurseurs en fait un candidat privilégié pour le développement et la diversification d'une aquaculture durable [24-29].



Figure 1-4. *Perca fluviatilis* (<http://www.arkive.org/perch/perca-fluviatilis/>).

⁷ Les effets d'une substitution des huiles animales par des huiles végétales dépendent de l'espèce (salmonidés, percidés, ...), du milieu (dulcicole *versus* marin), du régime alimentaire (herbivore/omnivore *versus* carnivore), du niveau de développement (juvénile *versus* adulte), du type d'huile végétale (tournesol, lin, colza, soja, palme, ...) et/ou de la composition initiale en acides gras ($\omega 3$ *versus* $\omega 6$). De manière générale : (1) la croissance est négativement impactée, (2) on observe une augmentation de la synthèse des acides gras, (3) celle-ci est insuffisante pour compenser le manque d'apport en acide gras via l'alimentation, (4) le changement de régime induit une modification perceptible de goût/saveur de la chair [138-148].



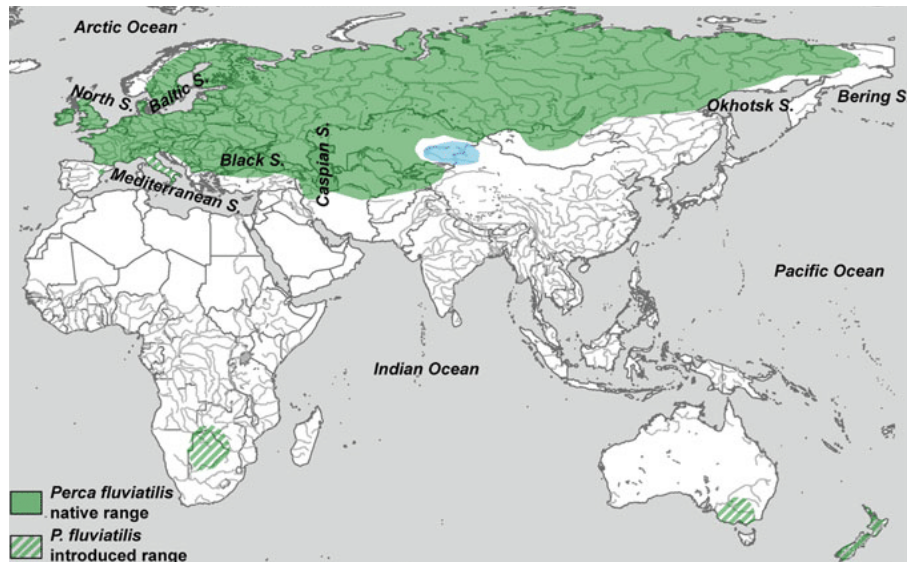


Figure 1-6. Répartition mondiale de *Perca fluviatilis* [31].

Tableau 1-3. Classification classique de *Perca fluviatilis*
([http://animaldiversity.org/accounts/Perca fluviatilis/classification/](http://animaldiversity.org/accounts/Perca_fluviatilis/classification/)).

Rangs taxonomiques	Position de la perche commune
Règne	Metazoa (Animalia)
Embranchement	Chordata
Sous-embranchement	Vertebrata
Super-classe	Gnathostomata
Classe	Actinopterygii
Sous-classe	Neopterygii
Super-ordre	Teleostei
Ordre	Perciformes
Famille	Percidae
Genre	<i>Perca</i>
Espèce	<i>fluviatilis</i>

3. Les acides gras comme base d'étude

3.1. Les acides gras sont des lipides

De nombreux composés sont considérés comme étant des lipides, ce qui fait de cette classe de molécules un ensemble hétérogène⁸. Néanmoins, tous les lipides sont réputés solubles dans les solvants organiques/non polaires (et insolubles dans l'eau) et dérivent d'une métabolisation de l'acétyl-CoA. Ce métabolite peut soit être polymérisé linéairement, formant alors des lipides dits saponifiables, c'est-à-dire pouvant être décomposé en un alcool et un acide (acides gras, glycérolipides, phospholipides, sphingolipides, glycolipides, polycétides), soit être polymérisé en isoprénoïdes, formant des lipides non saponifiables (terpènes, terpénoïdes, stéroïdes, eicosanoïdes) (Figure 1-7) [32].

⁸ Au point qu'il n'existerait pas de définition exacte de ce qu'est – ou devrait être – un lipide [32].

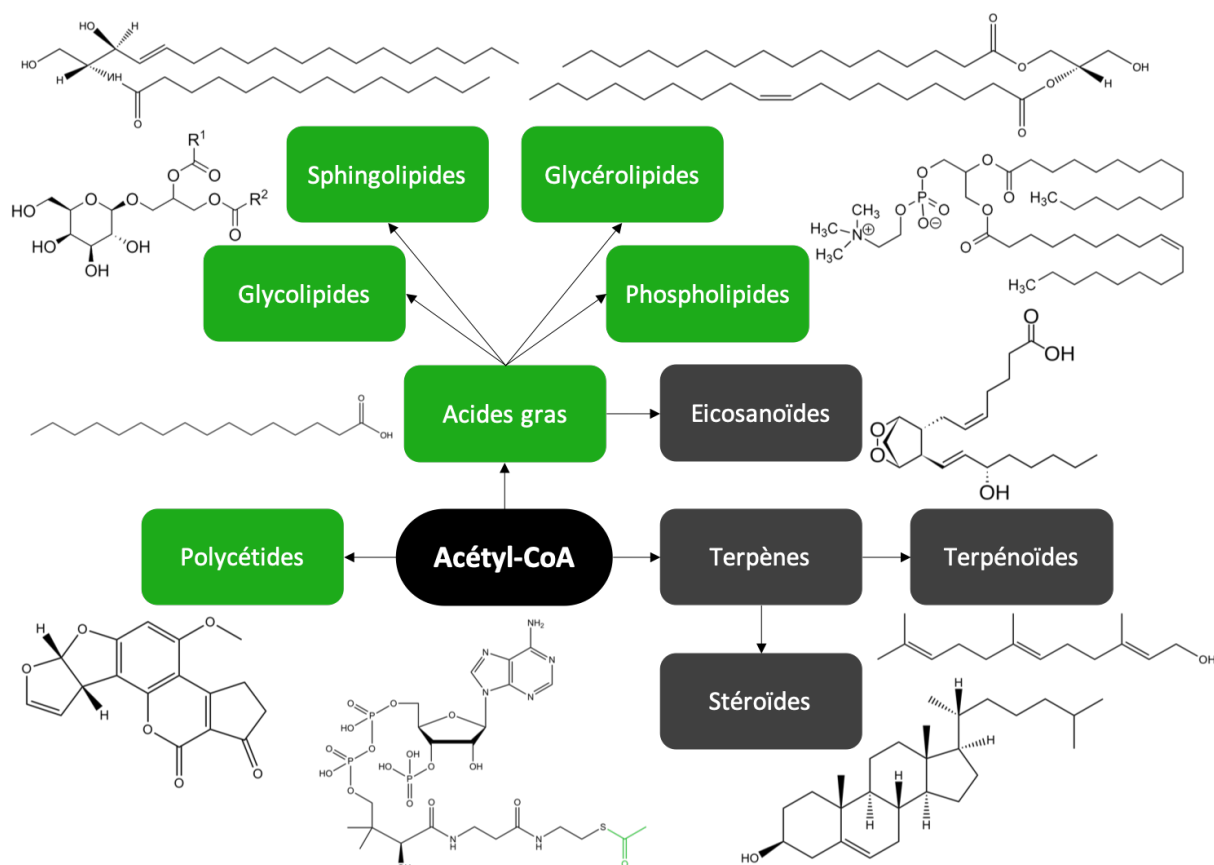


Figure 1-7. Les différentes classes de lipides dérivés de l'acétyl-CoA. Les lipides saponifiables sont colorés en verts et les lipides non saponifiables en gris (d'après [28]). Les différents exemples illustrés sont : l'acide hexadécanoïque (acide gras), le monogalactosyldiacylglycérol (glycolipide), la N-tétradécénoyl-sphing4-énine (sphingolipide), le 1-héxadécanoïl-2-octadécénoyl-sn-glycérol (glycérolipides), la 1-palmitoyl-3-oléoyl-phosphatidylcholine (phospholipide), la prostaglandine H₂ (eicosanoïde), le farnésol (terpénoïde), le cholestérol (stéroïde) et l'aflatoxine B1 (polycétide) (ChemBioDraw).

3.2. Nomenclature et structure des acides gras

Les acides gras sont des acides carboxyliques à chaîne aliphatique caractérisés par le nombre de carbones de celle-ci (Cx), la présence ou non de doubles liaisons (Cx:y) et leur position au sein de la chaîne, comptée soit par rapport au carboxyle (Cx:yΔz₁,...,z_r), soit à partir du méthyle terminal (Cx:yn-z/ωz) [33].

Par exemple, l'acide arachidonique est un acide gras à 20 carbones (C20), comportant 4 doubles liaisons (C20:4) en position 5, 8, 11 et 14 (C20:4Δ5,8,11,14), dont la dernière est positionnée à 6 carbones du méthyle terminal (C20:4n-6/ω6) (Figure 1-8).

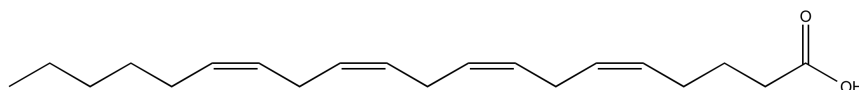


Figure 1-8. Acide arachidonique (C20:4Δ5,8,11,14 ou C20:4n-6 ou C20:4ω6) (ChemBioDraw).

Généralement, les acides gras possèdent un nombre pair de carbones ; dans le cas contraire, ils sont spécifiques d'une espèce et présents à l'état de traces. Dans le cas des insaturés, ils présentent une ou plusieurs doubles liaisons (rarement triples) non conjuguées de type 1,4-pentadiène (appelée « *methylene-interrupted* ») adoptant une conformation *cis*. Les acides

gras *trans* sont naturellement rares et sélectivement exclus des voies métaboliques [32]. En effet, les propriétés intéressantes (point de fusion et arrangement spatial) des isomères *cis* sont soit présentes de manière atténuée, soit complètement absentes [34].

D'un point de vue générique, on distinguera donc les acides gras en fonction de leur degré d'insaturation et de la longueur de leur chaîne (Tableaux 1-4 & 1-5) [32].

Tableau 1-4. Classification des acides gras [32].

	Saturés	Monoinsaturés	Polyinsaturés
Courte	SC-SFA (C1-C4)		SC-PUFA (C14-C18)
Moyenne	MC-SFA (C6-C12)		/
Longue	LC-SFA (C14-C24)	MUFA (C14-C24)	LC-PUFA/HUFA (C20-C24)
Très longue	/		VLC-PUFA (> C24)

Tableau 1-5. Quelques acides gras importants
(<https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iupac/lipid/appABC.html>).

Cx:yΔz ₁ ,...,z _y	Nom courant/Nom systématique	Abr.
Acides gras saturés (SFA)		
C16:0	Acide palmitique Acide hexadécanoïque	PA
C18:0	Acide stéarique Acide octadécanoïque	SA
Acides gras monoinsaturés (MUFA)		
n-7 (ω7)		
C16:1Δ9	Acide palmitoléique Acide <i>cis</i> -9-tétradécenoïque	POA
n-9 (ω9)		
C18:1Δ9	Acide oléique Acide <i>cis</i> -9-octadécénoïque	OLA
Acides gras polyinsaturés à chaîne courte (PUFA)		
n-6 (ω6)		
C18:2Δ9,12	Acide linoléique Acide <i>cis</i> -9,12-octadécadiénoïque	LA
C18:3Δ6,9,12	Acide γ-linolénique Acide <i>cis</i> -6,9,12-octadécatriénoïque	GLA
n-3 (ω3)		
C18:3Δ9,12,15	Acide α-linolénique Acide <i>cis</i> -9,12,15-octadécatriénoïque	ALA
C18:4Δ6,9,12,15	Acide stéaridonique Acide <i>cis</i> -6,9,12,15-octadécatétraénoïque	STA
Acides gras polyinsaturés à chaîne longue (HUFA)		
n-6 (ω6)		
C20:3Δ8,11,14	Acide dihomog-γ-linolénique Acide <i>cis</i> -8,11,14-eicosatriénoïque	DGLA
C20:4Δ5,8,11,14	Acide arachidonique Acide <i>cis</i> -5,8,11,14-eicosatétraénoïque	AA
n-3 (ω3)		
C20:5Δ8,11,14,17	Acide timnodonique Acide <i>cis</i> -5,8,11,14,17-eicosapentaénoïque	EPA
C22:6Δ4,7,10,13,16	Acide cervonique Acide <i>cis</i> -4,7,10,13,16,19-docosahexaénoïque	DHA

3.3. Fonctions des acides gras

Les acides gras assurent divers rôles dans les processus cellulaires et physiologiques des organismes.

Sous forme de triglycérides, ils constituent, via une β -oxydation, une source d'énergie et de carbone pour le métabolisme [35]. Chez les poissons, il s'agit de la source préférentielle d'énergie métabolique dédiée à la croissance, la reproduction et la nage. En témoigne la proportion élevée en huile de certaines espèces marines (plus de 20 % de la masse chez *Clupea harengus*) [36]. Inversement, l'énergie prélevée de la nourriture peut être stockée sous forme d'acides gras via la lipogenèse.

Sous forme de phosphoglycérolipides, ils structurent les membranes cellulaires. Leurs modifications (désaturation, élongation, estérification, ...) permettent aux cellules de modifier les propriétés physiques de leurs membranes (stabilité, fluidité, perméabilité, adhésion, ...) et peuvent affecter leur fonctionnalité (modulation de canaux ioniques, endocytose/exocytose, activité d'enzymes associées à la membrane, ...) [37].

Sous forme d'acides gras libres insaturés (SC-PUFA ou HUFA), ils sont précurseurs des oxylipines, des molécules signalétiques produites par des oxygénases (lipoxygénases, cyclooxygénases, cytochromes P450) et intervenant notamment dans la morphogenèse, la différenciation cellulaire, l'homéostasie, les processus reproductifs et les mécanismes de défense contre les pathogènes [38,39]. Chez les vertébrés, les oxylipines sont représentées par la famille des eicosanoïdes⁹ (prostaglandines, prostacyclines, thromboxanes, leucotriènes, résolvines, lipoxines, ...), des molécules de type « hormone-like » produites par les cellules de pratiquement tous les tissus et participant à la communication autocrine [40,41]. Les acides gras libres peuvent également jouer le rôle de ligands vis-à-vis de récepteurs couplés à une protéine G (GPCR) ou de facteurs de transcription, se retrouvant ainsi impliqués dans la transduction du signal et l'initiation de la transcription de gènes [42].

Tableau 1-6. Principales fonctions biologiques des acides gras LA, AA, EPA et DHA [40].

Acide gras	Principales fonctions biologiques
n-6 (ω6)	LA Synthèse de lipides impliqués dans l'imperméabilité épidermique
	AA Synthèse d'eicosanoïdes Composant de phospholipides inositol
n-3 (ω3)	EPA Synthèse d'eicosanoïdes Analogue structurel et compétiteur de l'AA
	DHA Structure des domaines lipidiques membranaires Modulation des protéines transmembranaires Métabolisme de la phosphatidyléthanolamine, des plasmalogènes d'éthanolamine et de la phosphatidylsérine Formation de radicaux libres Régulation de l'expression de gènes

Au niveau physiologique, les acides gras et leurs dérivés oxygénés interviennent dans la structuration du cerveau et du système nerveux central, la régulation de la fonction vasculaire, la régénération osseuse, la signalisation optique, la croissance tumorale, l'inflammation (chémotaxie, phagocytose), ... [43]. De manière plus générale, au niveau de l'organisme, les acides gras sont impliqués dans l'adaptation au froid et la survie chez les animaux

⁹ Les eicosanoïdes (dérivés d'acides gras de type C20, d'où leur nom) sont également présents chez les champignons, plantes inférieures, tandis que chez les plantes supérieures, les oxylipines sont représentées par la famille des octadécanoïdes (principalement dérivés, quant à eux, de C18) [39].

(particulièrement aux pôles), la formation des graines et du pollen chez les plantes, les mécanismes de défense contre les pathogènes (réponse immunitaire), ... [18]. A titre d'exemple, le Tableau 1-6 présente les principales fonctions biologiques de quatre acides gras essentiels.

4. Les enzymes du métabolisme lipidique comme thème d'étude

4.1. Biosynthèse des acides gras¹⁰

4.1.1. *Lipogenèse*

Les acides gras sont formés *de novo* chez tous les organismes par l'intermédiaire d'un système enzymatique cytosolique appelé acide gras synthase (FAS) à partir d'actétyl-CoA mitochondrial (provenant de la dégradation du pyruvate ou d'acides aminés) et de malonyl-CoA (formé à partir d'acétyl-CoA par l'acétyl-CoA carboxylase)¹¹, moyennant du NADPH comme cofacteur. Les produits finaux de la FAS sont les acides myristique (C14:0), palmitique (C16:0 – PA) et stéarique (C18:0), respectivement chez les champignons, les animaux et les plantes [44,45]. La FAS peut être soit de type I (eucaryotes) et correspondre à un complexe enzymatique multifonctionnel, soit de type II (procaryotes) et alors correspondre à une série de protéines monofonctionnelles. Chez les animaux, la FAS I est un homodimère comportant sept domaines : (1) *acyl carrier protein* (ACP), (2) malonyl-CoA/acetyl-CoA:ACP transacylase (MAT), (3) β -cétoacyl synthase (KS), (4) β -cétoacyl réductase (KR), (5) β -hydroxyacyl déshydratase (HD), (6) β -énoyl réductase (ER), (7) acyl-ACP thioesterase (TE) [46,47].

4.1.2. *Synthèse des SFA*

L'acide palmitique sert de précurseur à la synthèse des acides gras saturés, dont les principaux produits sont les acides stéarique (C18:0 – SA) et lignocérique (C24:0) (Figure 1-9) [48].

4.1.3. *Synthèse des MUFA*

Les acides palmitique et stéarique sont les deux précurseurs de l'ensemble des acides gras insaturés. Plus spécifiquement, le PA initie la voie des n-7 (ω 7) MUFA, comprenant les acides palmitoléique (C16:1 Δ 9 – POA) et vaccénique (C18:1 Δ 11), tandis que le SA initie la voie des n-9 (ω 9) MUFA, comprenant notamment l'acide oléique (C18:1 Δ 9 – OLA)¹² (Figure 1-9) [48].

4.1.4. *Synthèse des PUFA/HUFA*

Les MUFA sont à l'origine de plusieurs séries de PUFA/HUFA :

- celle des n-7 (ω 7), initiée par l'acide palmitoléique ;
- celle des n-9 (ω 9), initiée par l'acide oléique et dont le produit final est l'acide de Mead (C20:3 Δ 5,8,11) ;

¹⁰ Nous ne traiterons dans cette section que du cas des acides gras linéaires.

¹¹ Il est à noter que *Trypanosoma brucei* est capable de synthétiser des MC-SFA et des LC-SFA à partir d'acide butyrique (C4:0) moyennant un système d'élongases spécifiques (ELO1, ELO2 et ELO3), se passant ainsi de FAS [149].

¹² Il existe d'autres familles de MUFA plus anecdotiques (ω 1, ω 2, ω 4, ω 5, ω 10, ...). Synthétisés à partir des acides myristique (C14:0) et palmitique, on peut les retrouver chez les protistes, les plantes, les champignons ou les animaux. Ces MUFA sont à leur tour précurseurs de plusieurs séries de PUFA/HUFA [150–153].

- celle des n-6 (ω 6), également initiée par l'OLA et comprenant l'acide linoléique (C18:2 Δ 9,12 – LA), l'acide arachidonique (C20:4 Δ 5,8,11,14 – AA), l'acide d'Osbond (C22:5 Δ 4,7,10,13,16) ainsi que la série de VLC-PUFA C24-34:5 ;
- celle des n-3 (ω 3), elle aussi initiée par l'OLA et comprenant l'acide α -linoléique (C18:3 Δ 9,12,15 – ALA), l'acide timnodonique¹³ (C20:5 Δ 8,11,14,17 – EPA), l'acide cervonique¹⁴ (C22:6 Δ 4,7,10,13,16,19 – DHA) ainsi que la série de VLC-PUFA C24-34:6 (Figure 1-9) [48].

Il est à noter que la voie des ω 7 est encore mal caractérisée, tant au niveau de ses acteurs enzymatiques que de la finalité de ses produits, mais traduit fréquemment une déficience en EFA. L'acide de Mead (acide *cis*-5,8,11-eicosatriénoïque), quant à lui, est un HUFA produit *de novo* chez les vertébrés lors d'une carence en ω 3 et ω 6 alimentaires afin de d'augmenter la fluidité des membranes cellulaires et/ou de combler une carence en eicosanoïdes dérivés de l'acide arachidonique [35].

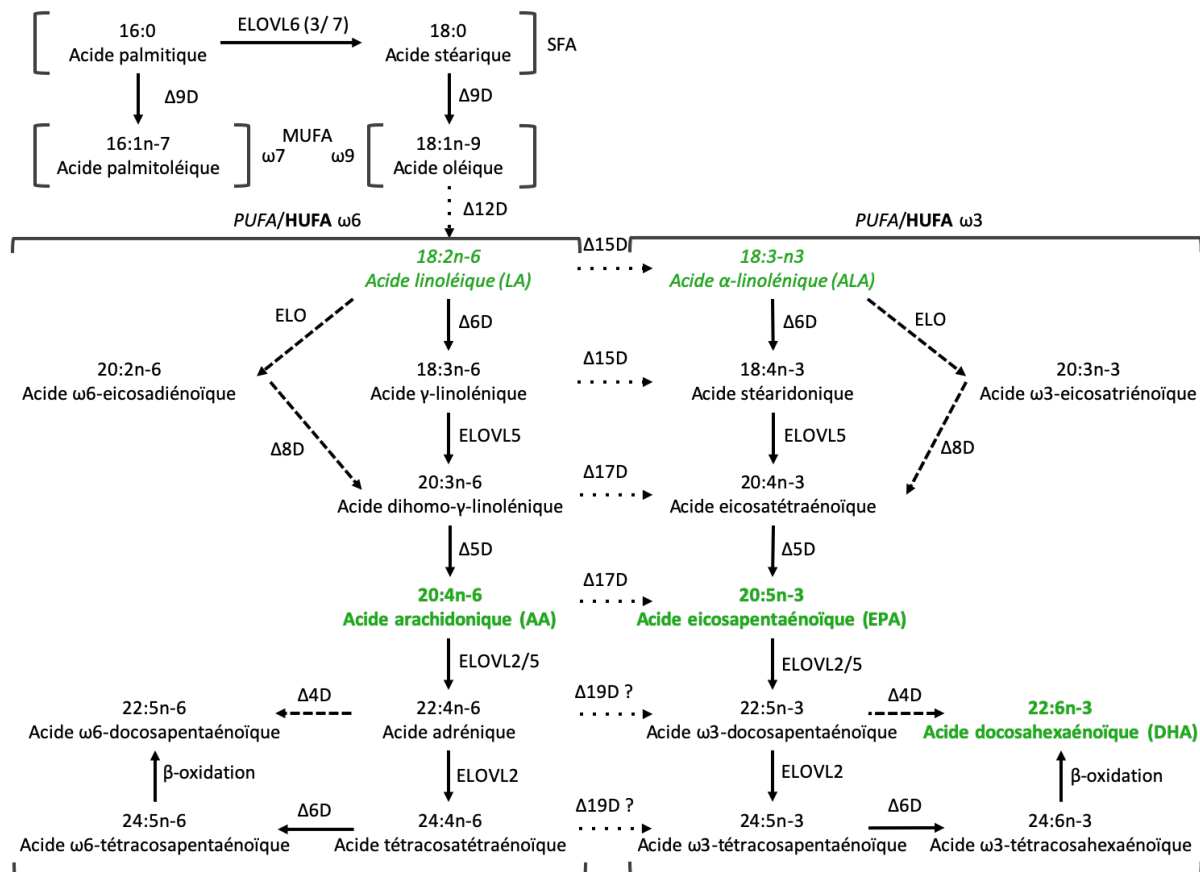


Figure 1-9. Voies de synthèse des PUFA et des HUFA chez les eucaryotes (d'après [49–51]). Les EFA sont signalés en vert, les PUFA en italique et les HUFA en gras. Les flèches pleines indiquent les voies classiques chez les vertébrés, celles en tirets les voies alternatives et celles en pointillés les voies absentes chez les vertébrés.

¹³ Généralement appelé acide eicosapentaénoïque, d'où l'abréviation « EPA ».

¹⁴ Généralement appelé acide docosahexaénoïque, d'où l'abréviation « DHA ».

4.2. Acteurs enzymatiques des voies de synthèse des acides gras

4.2.1. Acteurs multiples, systèmes multiples

A côté des différents types de FAS, il existe plusieurs systèmes de synthèse des acides gras ayant l'acide palmitique comme précurseur. A ce jour, quatre ont été mis en évidence :

- le système désaturases/élongases (Des/Elo), présent chez tous les organismes (eucaryotes comme procaryotes) et fonctionnant en conditions aérobies [52] ;
- un système dérivé de la FAS II qui intègre, en plus des enzymes classiques, une déshydratase/*trans*-2,*cis*-3 isomérase (DH/2,3I), actif chez certains procaryotes (*Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*) en conditions anaérobies [53] ;
- un système similaire à la polycétide synthase (PKS-like), présent à la fois chez les procaryotes (*Shewanella* spp., *Vibrio marinus*, *Photobacterium profundum*, *Moritella marina*) et les protistes (*Schizochytrium* spp.) et prenant le relais en conditions anaérobies [54,55] ;
- une hypothétique PUFA synthase, détectée chez certains protistes (*Schizochytrium* spp.) et fonctionnant également en conditions anaérobies [56].

Il est à noter que les deux derniers pourraient en fait n'en former qu'un seul, lequel pourrait correspondre soit à une série de protéines monofonctionnelles fonctionnant de concert (chez les procaryotes, à l'image de FAS II), soit à un complexe enzymatique multifonctionnel (chez les eucaryotes, à l'image de FAS I). Dans un cas comme dans l'autre, les activités suivantes seraient présentes : β -cétoacyl-ACP synthase (KAS), β -cétoacyl réductase (KR), β -hydroxyacyl déshydratase (HD), β -énoyl réductase (ER), déshydratase/*trans*-2,*cis*-3 isomérase (DH/2,3I), déshydratase/*trans*-2,*cis*-2 isomérase (DH/2,2I) [52]. Remarquons finalement que les voies de synthèse associées seraient sensiblement différentes par rapport au premier système cité (par exemple l'absence d'ALA et d'EPA dans la production de DHA). Dans la suite de ce travail, nous nous limiterons exclusivement au système Des/Elo ayant comme produits des acides gras insaturés.

4.2.2. Système Des/Elo

La synthèse des acides gras insaturés dont l'acide palmitique est le précurseur requiert deux types de réaction : la désaturation et l'élongation, catalysées respectivement par des désaturases et des élongases d'acides gras [18].

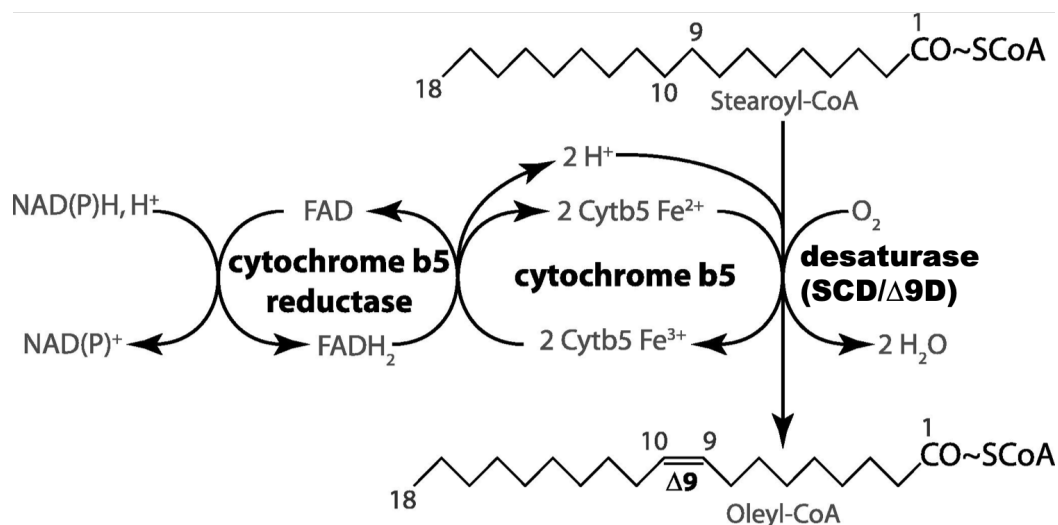


Figure 1-10. Exemple de désaturation d'un acide gras long associé au coenzyme A (acide gras sous forme libre) [48].

La désaturation est un processus aérobie se déroulant en membrane du réticulum endoplasmique¹⁵ lisse (REL) et nécessitant une oxygénase terminale (une désaturase d'acides gras dans ce cas précis), des équivalents réducteurs (NADH préférentiellement ou NADPH) et une chaîne de transport d'électrons (cytochrome b_5 /cytochrome b_5 réductase, cytochrome b_5 /cytochrome P450 réductase ou ferrédoxine/ferrédoxine réductase) (Figure 1-10) [57–59]. Les deux étapes limitantes de la synthèse des HUFA sont les désaturations $\Delta 9$ et $\Delta 6$, respectivement celles des PA et SA et celles des LA et ALA (Figure 1-9) [60].

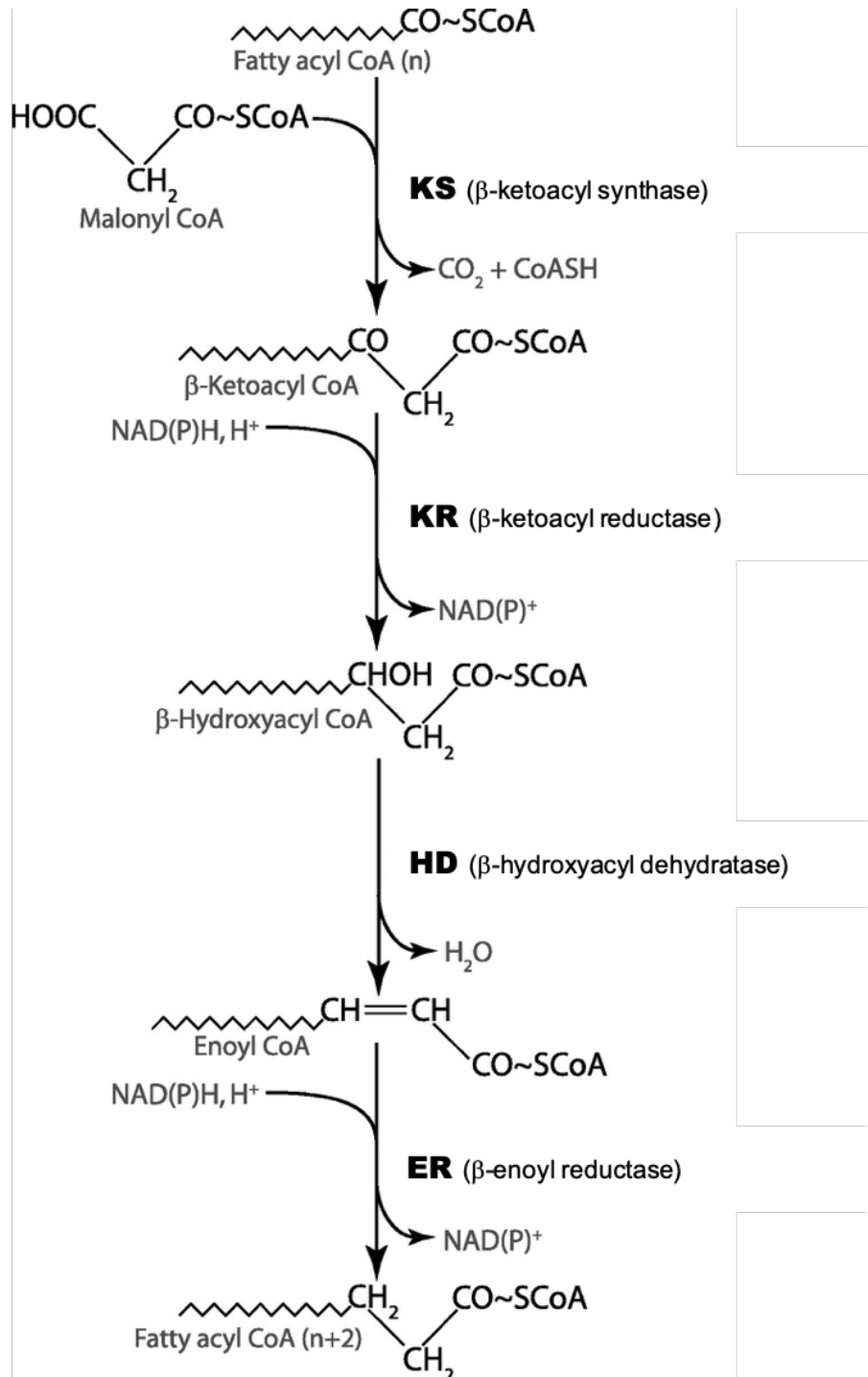


Figure 1-11. Exemple d'élargissement d'un acide gras long [48].

¹⁵ Organite cellulaire faisant partie du système endomembranaire chez les eucaryotes.

L'élongation est un processus en quatre étapes se déroulant principalement dans le REL, mais aussi de manière plus anecdotique dans les mitochondries (biogenèse des membranes mitochondriales) et les peroxysomes (synthèse de VLC-PUFA). Quatre enzymes différentes sont requises : une β -cétoacyl synthase (KS), une β -cétoacyl réductase (KR), une β -hydroxyacyl déshydratase (HD) et une *trans*-2,3-énoyl réductase (ER) (Figure 1-11) [34]. La KS, responsable de la réaction de condensation, est le facteur limitant de l'élongation¹⁶. En effet, c'est une enzyme spécifique du substrat à deux niveaux : la longueur de la chaîne et le degré d'insaturation. C'est donc la KS qui sera spécifiquement visée par le terme « d'élongase » [49]. Notons enfin que les deux réductases nécessitent le concours d'équivalents réducteurs (NADH ou préférentiellement NADPH pour la première, NADPH pour la seconde) et d'une chaîne de transport d'électrons (cytochrome b₅/cytochrome P450 réductase) [34].

Il est à noter qu'à côté des étapes limitantes propres au système Des/Elo, trois autres éléments peuvent potentiellement limiter la synthèse des HUFA :

- la disponibilité en malonyl-CoA (synthétisé par l'acétyl-CoA carboxylase) ;
- la disponibilité en équivalents réducteurs de type NADH ou NADPH (synthétisés par la glucose-6-phosphate déshydrogénase ou la malate déshydrogénase) ;
- l'absence des enzymes impliquées dans la voie de synthèse (tant au niveau génomique que protéomique), justifiant certains besoins alimentaires [61].

Par ailleurs, vis-à-vis du substrat, les enzymes métabolisant les PUFA présentent une préférence pour les substrats de la série des ω 3, engendrant un biais dans le ratio tissulaire ω 3: ω 6 [62].

4.2.3. Besoins alimentaires en acides gras essentiels

Tous les organismes n'ont pas les mêmes besoins en acides gras¹⁷ et tous n'ont pas la même capacité à synthétiser ceux qui leur sont nécessaires.

Ainsi, contrairement aux animaux, les plantes sont capables de synthétiser tous les acides gras dont elles ont besoin (SFA, MUFA, PUFA). En revanche, elles sont dépourvues de HUFA – les quelques exceptions (par exemple *Borago officinalis*) concernent exclusivement la formation des graines [35]. On retrouvera donc chez ce groupe d'organismes les activités de désaturation responsables des voies de synthèse SFA \rightleftharpoons MUFA et MUFA \rightleftharpoons PUFA. Au contraire, les désaturations associées aux réactions PUFA \rightleftharpoons HUFA et HUFA \rightleftharpoons VLC-PUFA seront absentes.

A l'opposé des plantes, les poissons (et de manière générale, tous les vertébrés) ont un besoin alimentaire absolu pour les ω 3/ ω 6-PUFA, étant dépourvus des désaturases responsables de la synthèse du LA et de l'ALA (présentes seulement chez quelques espèces d'animaux, comme par exemple *Caenorhabditis elegans*). Il n'en va pas de même pour les HUFA, puisque seules les espèces marines requièrent un apport alimentaire en C20 (AA et EPA) et C22 (DHA) (Tableau 1-7). Cette nécessité est le résultat d'un régime exclusivement carnivore et d'une adaptation à l'abondance des PUFA et HUFA dans les réseaux trophiques des mers et océans [61]. En effet, la grande majorité des poissons marins (y compris ceux utilisés en aquaculture) sont piscivores et se nourrissent d'espèces plus petites, elles-mêmes consommatrices de

¹⁶ En membrane du REL. Dans les peroxysomes, c'est l'ER qui est l'enzyme limitante [60].

¹⁷ Ces besoins ont été déterminés par analyse de la composition lipidique des différents tissus (contenu en valeur absolue, ratios, types de lipides présents, ...) à différents stades (œufs, larves, juvéniles, adultes) en rapport avec différents régimes alimentaires carencés et leurs éventuelles pathologies subséquentes.

Tableau 1-7. Besoins alimentaires en acides gras essentiels (EFA) de quelques espèces de poissons dulcicoles et marins [23].

Espèce	EFA ou série	Besoin (% de matière sèche)
Espèces dulcicoles		
Truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	18:3n-3	0,7–1,0
	n-3 HUFA	0,4–0,5
Saumon du Pacifique (<i>Oncorhynchus keta</i>)	18:2n-6 & 18:3n-3	1,0 de chaque
Saumon coho (<i>Oncorhynchus kisutch</i>)	18:2n-6 & 18:3n-3	1,0 de chaque
Saumon du Japon (<i>Oncorhynchus masou</i>)	18:3n-3 ou n-3 HUFA	1,0
Omble chevalier (<i>Salvelinus alpinus</i>)	18:3n-3	1,0–2,0
Carpe commune (<i>Cyprinus carpio</i>)	18:2n-6	1,0
	18:3n-3	0,5–1,0
Carpe chinoise (<i>Ctenopharyngodon idella</i>)	18:2n-6 & 18:3n-3	1,0 & 0,5
Tilapia zilli (<i>Oreochromis zilli</i>)	18:2n-6	1,0
Tilapia du Nil (<i>Oreochromis niloticus</i>)	18:2n-6	0,5
Anguille du Japon (<i>Anguilla japonica</i>)	18:2n-6 & 18:3n-3	0,5 de chaque
Ayu (<i>Plecoglossus altivelis</i>)	18:3n-3 ou 20:5n-3	1,0
Chanos (<i>Chanos chanos</i>)	18:2n-6 & 18:3n-3	0,5 de chaque
Barbue de rivière (<i>Ictalurus punctatus</i>)	18:3n-3	1,0–2,0
	n-3 HUFA	0,5–0,75
Lavaret (<i>Coregonus laveratus</i>)	n-3 HUFA	0,5–1,0
	18:3n-3	>1,0
Silure glane (<i>Silurus glanis</i>)	18:3n-3	1,0
Espèces marines		
Turbot (<i>Scophthalmus maximus</i>)	n-3 HUFA	0,8
	AA	~0,3
Dorade japonaise (<i>Pagrus major</i>)	20:5n-3 ou n-3 HUFA	0,5
	20:5n-3	1,0
	22:6n-3	0,5
Daurade royale (<i>Sparus aurata</i>)	n-3 HUFA	0,9 (DHA:EPA = 1)
	n-3 HUFA	1,9 (DHA:EPA = 0,5)
	DHA:EPA	0,5
Carangue dentue (<i>Pseudocaranx dentex</i>)	22:6n-3	1,7
Bar commun (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	n-3 HUFA	1,0
Limande jaune (<i>Pleuronectes ferrugineus</i>)	n-3 HUFA	2,5
Sargue doré (<i>Rhabdosargus sarba</i>)	n-3 HUFA	1,3
Sébaste de Corée (<i>Sebastes schlegelii</i>)	n-3 HUFA	0,9
	EPA ou DHA	1,0
Ombrine ocellée (<i>Sciaenops ocellatus</i>)	n-3 HUFA	0,5–1,0 (DHA:EPA = 1)

zooplancton, lequel prélève les EFA directement du phytoplancton, producteur primaire synthétisant *de novo* les PUFA et les HUFA. L'abondance de ces derniers dans les algues¹⁸

¹⁸ Protistes ou plantes inférieures en fonction de l'espèce.

marines (plus de 20 % des acides gras totaux) permet d'assurer un apport suffisant en acides gras essentiels même à une espèce herbivore, qui n'a de ce fait qu'un besoin faible (voire nul) de convertir les PUFA en HUFA [63]. En eaux douces, les C18 (LA et ALA) sont plus abondants que les C20, y compris dans les algues¹⁹ et les invertébrés, d'où la capacité des espèces dulcicoles (comme par exemple *P. fluviatilis*, *Oreochromis niloticus*, *Oncorhynchus mykiss*, *Chirostoma estor*, *Danio rerio*, ...), généralement herbivores ou omnivores, à convertir les PUFA en HUFA²⁰. Le même constat peut être dressé pour les espèces anadromes²¹ (comme *Salmo salar*) et euryhalines²² (par exemple *Siganus canaliculatus*) [23]. Le brochet (*Esox lucius*) constitue une exception notable : étant un poisson dulcicole exclusivement piscivore (superprédateur au sommet de la chaîne alimentaire), il se révèle incapable de convertir les PUFA en HUFA [64].

Cette adaptation au régime alimentaire et au milieu de vie est perceptible au niveau moléculaire. Ainsi, chez les poissons d'eau douce, toutes les enzymes concernées par le métabolisme des HUFA seraient présentes, au contraire des poissons marins qui montrent une capacité de biosynthèse *de novo* limitée, soit à cause d'une répression des acteurs enzymatiques, soit à cause de leur absence [36,65,66].

Il est à noter que, malgré la ségrégation apparente PUFA/plantes et HUFA/animaux, l'ensemble de la voie de synthèse SFA ⇌ MUFA ⇌ PUFA ⇌ HUFA peut se rencontrer chez divers organismes, tels que les plantes inférieures (*Ostreococcus tauri*), les champignons (*Mortierella alpina*), divers protistes (*Isochrysis galbana*, *Thraustochytrium* spp., ...) mais aussi certains invertébrés (*C. elegans*, insectes) et plantes supérieures (*B. officinalis*, *Anemone leveillei*). De plus, chez ces dernières, la frontière s'estompe encore un peu plus avec la construction d'organismes génétiquement modifiés, comme *Arabidopsis thaliana*, *Brassica juncea*, *B. napus*, *B. carinata*, *Camelina sativa* ou encore *Glycine max*, dont les graines sont désormais capables de produire de l'AA, de l'EPA et du DHA grâce à des désaturases et des élongases d'origines diverses (protistes, algues, champignons, plantes inférieures, poissons, ...) [67–69].

4.3. Désaturases d'acides gras

4.3.1. Classification des FAD

Les désaturases d'acides gras (FAD) se caractérisent par leur extraordinaire diversité. Ce faisant, il existe plusieurs approches afin de les classer : en fonction du type d'estérification du substrat, de la nature du système redox associé, de la solubilité des enzymes, de leur localisation subcellulaire ou de leur régiosélectivité [45,70].

Les acides gras peuvent se présenter sous trois formes : complexés au coenzyme A (acyl-CoA), estérifiés à un phospholipide (acyl-lipide) ou thioestérifiés à une *acyl carrier protein* (acyl-ACP). Les acyl-CoA désaturases se retrouvent généralement chez les animaux et les champignons, les acyl-lipide désaturases chez les plantes, les protistes et les cyanobactéries, tandis que les acyl-ACP désaturases sont spécifiques des plastes²³ [45].

¹⁹ Protistes ou plantes inférieures en fonction de l'espèce.

²⁰ Notons toutefois que les besoins alimentaires en acides gras essentiels de la perche ne sont pas connus.

²¹ Espèces initiant leur cycle de vie dans les rivières avant de rejoindre la mer.

²² Espèces capables de supporter de grandes variations de salinité de l'eau environnante. Il s'agit typiquement d'espèces d'eaux saumâtres (estuaires par exemple).

²³ Organite cellulaire d'eucaryotes végétaux tels que les algues et les plantes, à l'exclusion des champignons et des protistes. Il en existe différentes sortes : chloroplaste (permet la photosynthèse), chromoplaste (contient des pigments de type caroténoïdes), amyloplaste (stocke de l'amidon), ...

Toutes les désaturases nécessitent la présence d'un système redox pour fonctionner, dont le donneur d'électron correspond soit au cytochrome b_5 (NADH-dépendant ; REL des eucaryotes), soit à la ferrédoxine (NADPH-dépendant ; cyanobactéries et plastes).

Les désaturases sont soit solubles (cas unique des acyl-ACP désaturases présentes dans le stroma²⁴ des plastes), soit intégrées en membrane du réticulum endoplasmique ou des plastes.

Du point de vue de la régiosélectivité, les FAD « incorporent » une double liaison soit au milieu d'une chaîne saturée (« primo-désaturases »), soit à partir du carbone terminal (« *methyl-end* »), soit entre le groupement carboxylique et une double liaison préexistante (« *front-end* »).

4.3.2. Origine et diversité des FAD

Les $\omega 6$ - et $\omega 3$ -HUFA peuvent être synthétisés suivant plusieurs voies et font intervenir au total huit types de désaturation²⁵ : $\Delta 4$, $\Delta 5$, $\Delta 6$, $\Delta 8$, $\Delta 9$, $\omega 6/\Delta 12$, $\omega 3/\Delta 15$, $\omega 3/\Delta 17$ (Figure 1-9). Du point de vue évolutif, la famille des désaturases s'est diversifiée avant la radiation des eucaryotes²⁶. Ainsi, trois sous-familles ont été identifiées, au sein desquelles la divergence est basée sur la phylogénie plutôt que sur la fonction : les primo-désaturases, les désaturases de type « *methyl-end* » et celles de type « *front-end* » (Figure 1-12 ; Tableau A-1²⁷) [71,72].

Les primo-désaturases, dont la stéaryl-CoA désaturase (SCD/ $\Delta 9$ D) et les acyl-ACP désaturases solubles, sont les seules désaturases du groupe à insérer une double liaison au milieu d'une chaîne aliphatique saturée. Ainsi, la SCD/ $\Delta 9$ D, présente chez tous les organismes, est l'étape limitante de la synthèse des MUFA (et donc des PUFA et HUFA) [50]. Etant donné son universalité et sa position dans la voie de synthèse des acides gras insaturés, il semblerait que la SCD/ $\Delta 9$ D soit l'ancêtre commun de l'entièreté de la famille des désaturases. Deux clades²⁸ ont été identifiés : l'un comprenant les cyanobactéries et les plantes, l'autre les champignons et les animaux [73]. Il est à noter que le groupe des acyl-ACP désaturases solubles n'a aucun lien évolutif avec les autres FAD [74].

Les désaturases de type « *methyl-end* » (MED), dont font partie les $\omega 6/\Delta 12$, $\omega 3/\Delta 15$ et $\omega 3/\Delta 17$ désaturases, absentes chez les champignons et les animaux à quelques exceptions près (par exemple *M. alpina*, *C. elegans*, *Periplaneta americana* ou *Acheta domesticus*), insèrent une double liaison à respectivement 6 et 3 carbones de l'extrémité méthyl-terminale [57]. Les MED résultent d'une diversification de la SCD/ $\Delta 9$ D chez les eucaryotes, la $\omega 6/\Delta 12$ étant vraisemblablement la première à avoir émergé (étape limitante de la synthèse des PUFA). Trois clades ont été identifiés : 1°) la $\Delta 12$ D soluble présente chez les cyanobactéries et les plastes (qui partagent une origine commune), 2°) la $\Delta 12$ D microsomale²⁹ des plantes et des champignons, et 3°) la $\Delta 15$ D des cyanobactéries (soluble), des plantes (soluble et microsomale), des champignons (microsomale) et des animaux (microsomale) [75].

Les désaturases de type « *front-end* » (FED), présentes de manière variable chez de nombreuses espèces (protistes, champignons, animaux mais généralement absentes chez les

²⁴ Equivalent du cytosol chez les plastes.

²⁵ Il est à noter qu'une même enzyme peut prendre en charge une (monofonctionnelle) ou plusieurs activités de désaturation (généralement bifonctionnelle).

²⁶ Emergence des différents groupes d'organismes eucaryotes, tels que les plantes, les champignons, les animaux, ...

²⁷ Voir Annexes.

²⁸ Groupe d'organismes comprenant un ancêtre commun et la totalité de ses descendants.

²⁹ Insérée en membrane du REL.

4.3.3. Caractéristiques structurales et fonctionnelles des FED

Les FED sont des enzymes transmembranaires du REL³¹ comportant 1°) 4 hélices α transmembranaires³², 2°) un domaine cytochrome b_5 fusionné à leur extrémité N-terminale (incluant le motif de liaison à l'hème HPGG)³³, 3°) un site actif comprenant deux ions Fe^{3+} et 4°) huit résidus histidine regroupés en « boîtes His » (HDxGH, HxxHH et QxxHH)³⁴ [57]. Le site actif, le cytochrome fusionné et les extrémités N- et C-terminales sont orientés vers le cytosol. Toutes les FED utilisent la voie des cytochromes comme système redox et un acyl-CoA comme précurseur (PUFA ou HUFA), insérant une double liaison à n carbones de l'extrémité carboxyl-terminale. Les acides gras ainsi synthétisés comportent donc de multiples liaisons doubles de type « *methylene-interrupted* » en configuration *cis*. Chez les vertébrés, les désaturases « *front-end* » présentent une régiosélectivité très spécifique vis-à-vis de leur substrat, contrairement aux invertébrés et aux protistes [76].

4.3.4. FED chez les poissons

Chez les poissons, plusieurs FED ont été identifiées. La plus fréquemment rapportée est la $\Delta 6D$, présente chez les espèces dulcicoles [77-84], marines [81,85-97], anadromes [98-100] et catadromes [101,102]. Jusqu'à présent, la $\Delta 5D$ n'a été isolée que chez les salmonidés (*O. mykiss*, *S. salar*) [84,103] et la $\Delta 4D$ que chez *Solea senegalensis* [104]. Des désaturases bifonctionnelles ont également été identifiées : une $\Delta 4\Delta 5D$ chez *S. canaliculatus* [105], une $\Delta 5\Delta 6D$ chez *Channa striata* [106], *C. estor* [107], *D. rerio* [108], *O. niloticus* [109] et *S. canaliculatus* [105,110], une $\Delta 6\Delta 8D$ chez *Arapaima gigas* [111], *Lates calcarifer* [112] et *Paralichthys olivaceus* [89].

D'un point de vue structural, les désaturases de poisson comprennent l'ensemble des motifs conservés évoqués plus haut (hélices α transmembranaires, cytochrome b_5 fusionné, boîtes His)³⁵. Leur séquence varie de 444 à 454 acides aminés (444 chez les espèces dulcicoles, 445-447 chez les marines et 454 chez les salmonidés) [113].

D'un point de vue fonctionnel, la $\Delta 6$ désaturase intervient deux fois au cours de la synthèse des HUFA : lors de la désaturation des C18 et des C24 (Figure 1-9). La $\Delta 5D$, quant à elle, ne désature que les C20. Dans un cas comme dans l'autre, elles affichent une préférence pour les acides gras de la série $\omega 3$. En outre, la $\Delta 6D$ des espèces dulcicoles présente une plus forte activité dans le foie que dans le cerveau, contrairement aux espèces marines, dont le rôle principal est le maintien d'un niveau optimal en DHA dans les tissus nerveux [20].

³¹ La localisation a été déterminée par isolation des protéines à partir de la fraction cellulaire microsomale et reconstitution du système en liposomes (à la fois pour les désaturases SCD/ $\Delta 9D$ et $\Delta 6D$) [58,155,156] dans un premier temps, par des expériences d'immunofluorescence et/ou d'expression cellulaire ectopique dans un second temps (seulement pour la SCD/ $\Delta 9D$) [157,158].

³² La présence d'hélices α transmembranaires est principalement basée sur l'établissement d'un profil d'hydrophatie (à la fois pour les désaturases SCD/ $\Delta 9D$ et FED) [111,157-161].

³³ La présence d'un domaine cytochrome b_5 fusionné a été déterminée expérimentalement par alignement de séquences entre des désaturases issues d'organismes phylogénétiquement éloignés (protistes, plantes, champignons, animaux) [162,163]. L'importance de ce domaine et son implication dans la mécanistique réactionnelle ont été déterminées par des expériences de reconstitution du système en liposomes et de construction de protéines chimériques chez des champignons (SCD/ $\Delta 9D$) et des mammifères (SCD/ $\Delta 9D$ et $\Delta 6D$) [58,59,155,156,161,164].

³⁴ La conservation de ces résidus, leur importance et leur implication dans la mécanistique réactionnelle ont été déterminées expérimentalement par alignement de séquences d'une part, et par des expériences de mutagenèse dirigée et de construction de protéines chimériques d'autre part ($\Delta 9$ -S-ACP-DES, SCD/ $\Delta 9D$, $\Delta 12\Delta 15D$ et $\Delta 6D$) [71,158,159,165-170].

³⁵ Informations inférées par alignement de séquences.

Contrairement aux mammifères, qui affichent des groupes bien séparés pour les différentes lignées de désaturases, les FED de poissons se ségrègent suivant les relations phylogénétiques entre groupes d'espèces (Cypriniformes, Salmoniformes, Gadiformes, Perciformes et Pleuronectiformes). Ainsi, à titre d'exemple, la $\Delta 5\Delta 6D$ de *S. canaliculatus* (Perciformes) est plus proche de la $\Delta 4D$ de cette même espèce que de la $\Delta 5\Delta 6D$ de *D. rerio* (Cypriniformes) (Figure 1-13) [62].

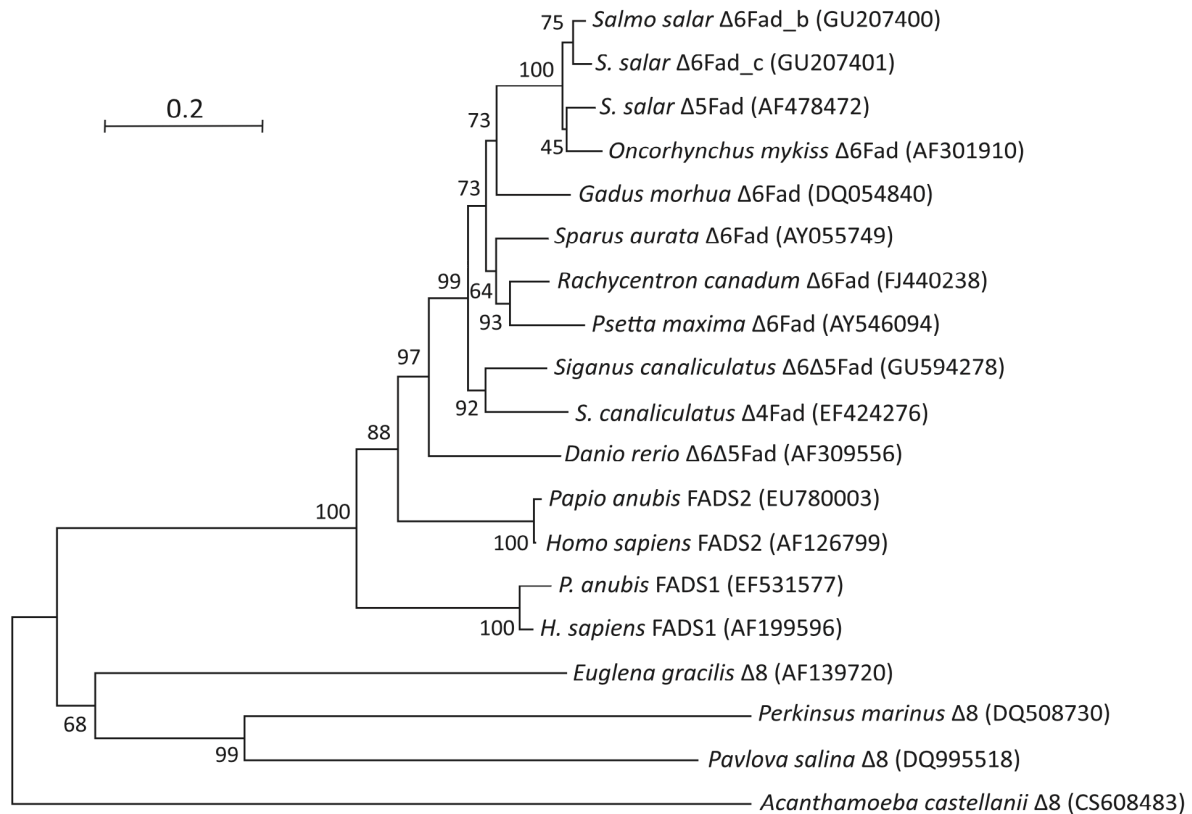


Figure 1-13. Phylogénie des FED chez les poissons [114].

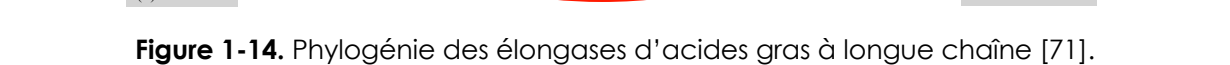
4.4. Elongases d'acides gras à longue chaîne

4.4.1. Systèmes d'élongation

Il existe plusieurs systèmes d'élongation des acides gras, impliquant différents intervenants « KS-like » (FAS, KAS, PKS-like, ELO, FAE-like, CER-like) [49,52-55,115] et substrats (acétyl-CoA/malonyl-ACP pour les trois premiers systèmes et acétyl-CoA/malonyl-CoA pour les trois suivants). Comme déjà évoqué, le terme générique « élongase » concerne la β -cétoacyl synthase (KAS, ELO, FAE-like, CER-like), qui est responsable de l'élongation et de la spécificité de l'acide gras (en terme de longueur de chaîne et de degré d'insaturation) – cette spécificité en fait donc l'enzyme limitante du système [53].

Chez les poissons (et les vertébrés de manière générale), les HUFA sont métabolisés via le système ELO par une KS de type ELOVL. Dans la suite de ce travail, c'est sur ce système d'élongation que nous nous focaliserons.

Chez les champignons et les invertébrés, diverses élongases ont été identifiées, toutes appartenant au système ELO. Etant donné la diversité de leurs fonctions, de leurs substrats et de leurs produits, il n'est malheureusement pas possible de faire un parallèle entre celles-ci et celles des vertébrés, dont la nomenclature a été standardisée et uniformisée afin de construire le « sous-système ELOVL » que nous développons ci-après (Tableau A-2³⁶).



³⁷ Ces événements duplicatifs sont responsables de néofonctionnalisations, telles que celles observées chez les désaturases et les élongases des poissons.

duplication - « WGD ») et juste avant l'explosion radiative des vertébrés. En effet, toutes les ELOVL5 sont plus proches les unes des autres que deux ELOVL au sein d'une même espèce (Figure 1-15) [117,118].

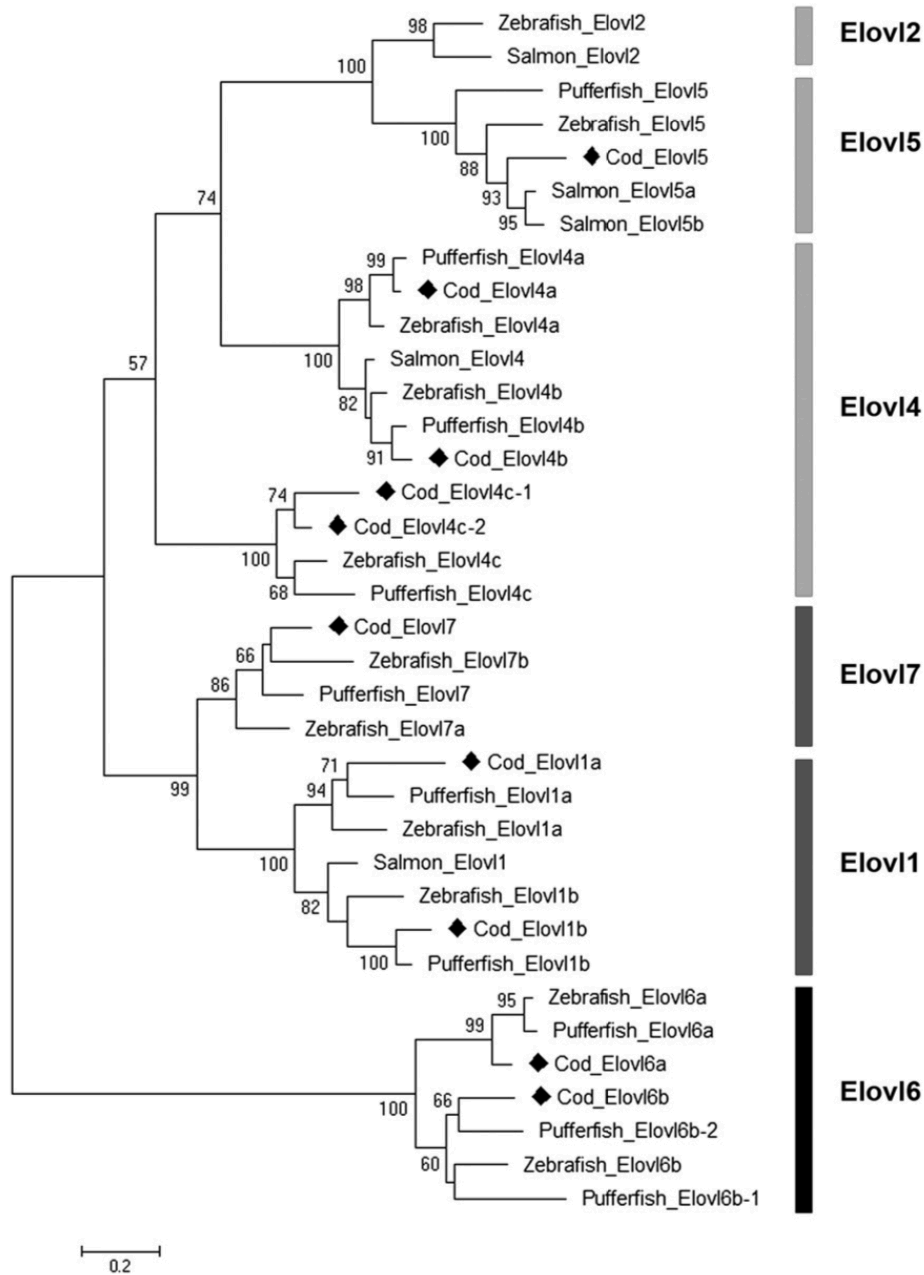


Figure 1-15. Phylogénie des ELOVL chez les poissons [117].

4.4.1. Caractéristiques structurales et fonctionnelles des ELO(VL)

Les élongases ELO(VL) sont des enzymes transmembranaires du REL³⁸ comportant plusieurs hélices α ³⁹, un signal de rétention au RE dans la région C-terminale (KKxx ou RKxx) et 4 motifs conservés : une boîte KEDT (KxxExxDT), une boîte His (QxxFLHxYHH), une boîte

³⁸ La localisation a été déterminée par des expériences d'immunofluorescence et/ou d'expression cellulaire ectopique [119,171,172].

³⁹ La présence d'hélices α transmembranaires est principalement basée sur la présence d'acides aminés de nature lipophile dont le nombre ne fait pas consensus dans la littérature [62,137].

Tyr (NxxxHxxMYxYY) et une boîte Gln (TxxQxxQ)⁴⁰ [119]. De même que les désaturases FED, les élongases ELO(VL) utilisent un acyl-CoA comme substrat, qui correspond en fait au PUFA/HUFA désaturé par les premières. Chez les vertébrés, les ELOVL présentent une faible spécificité au substrat, ne le discriminant ni sur base de sa longueur, ni sur le nombre de doubles liaisons [53].

4.4.2. ELOVL chez les poissons

Six des sept ELOVL actuellement décrites ont été identifiées chez les poissons – l'absence d'ELOVL3 pourrait s'expliquer en raison de son implication au niveau du tissu adipeux brun, absent chez les organismes poïkilothermes⁴¹ [117]. ELOVL2, 4 et 5 ont été identifiées chez des espèces dulcicoles [78,79,82,107,108,120–125], marines [88,89,95–97,104,117,126–132], anadromes [98,103,133–135] et catadromes [101,102,136].

D'un point de vue structural, toutes les ELOVL des poissons présentent les caractéristiques conservées évoquées plus haut (hélices α transmembranaires, signal de rétention au RE, quatre boîtes spécifiques)⁴². Leur séquence varie de 288 à 294 acides aminés [137].

D'un point de vue fonctionnel, ELOVL2 présente chez les poissons une préférence pour les C20 et C22 (avec une affinité « résiduelle » pour les C18) et ELOVL5 pour les C18 et C20 (avec une affinité « résiduelle » pour les C22) – contrairement aux mammifères, chez lesquels la préférence vis-à-vis de l'acide gras est exclusive [119]. ELOVL4, quant à elle, n'est présente que dans un nombre restreint de tissus (cerveau, yeux, gonades) et montre une activité exclusivement envers les C22 de la série ω 3 (impliqués dans la synthèse de DHA, très présents dans ces tissus) [125]. De même que les désaturases, les élongases affichent une préférence pour les acides gras de la série ω 3 [137].

5. La synthèse des acides gras dans le système désaturases/élongases comme sujet d'étude

La synthèse des acides gras est un processus biochimique complexe dans lequel plusieurs systèmes non exclusifs se côtoient (Des/Elo, FAS II, PKS-like, PUFA synthase). Celui basé sur l'association de désaturases et d'élongases d'acides gras est de loin le plus répandu et le plus étudié, comme en atteste le nombre croissant de séquences isolées et identifiées chez une grande variété d'organismes, allant des bactéries aux mammifères. Cependant, des zones d'ombre persistent, tant sur la structure des acteurs enzymatiques que sur la mécanistique des voies de synthèse. Ainsi, seule la stéaryl-CoA désaturase (SCD/ Δ 9D) dispose d'une structure tridimensionnelle déterminée expérimentalement, confirmant l'organisation en quatre hélices α transmembranaires des primo-désaturases membranaires (Tableau A-1). En revanche, aucune donnée sur la masse moléculaire, le point isoélectrique, la présence d'un éventuel peptide signal ou encore la définition du site catalytique n'est rapportée dans la littérature. Concernant les élongases, l'organisation membranaire de ces protéines ne fait pas consensus et l'absence de

⁴⁰ La conservation de ce signal d'adressage et de ces motifs a été déterminée expérimentalement par alignement de séquences entre des élongases issues d'organismes phylogénétiquement éloignés (protistes, champignons, animaux) [49,71,124]. L'importance des acides aminés présents et leur implication dans la mécanistique réactionnelle ont été déterminées par des expériences de mutagenèse dirigée et de construction de protéines chimériques chez des eucaryotes unicellulaires [173–175] et chez la souris en ce qui concerne la boîte His de l'élongase ELOVL4 [176].

⁴¹ Organismes ne contrôlant pas leur température corporelle.

⁴² Informations inférées par alignement de séquences.

structures (théoriques ou expérimentales) ne permet pas de proposer de mode d'interaction enzyme-substrat ou d'association entre les deux composantes du système Des/Elo (Tableau A-2).

6. Bibliographie

- [1] P. D'Odorico, J.A. Carr, F. Laio, L. Ridolfi, S. Vandoni, Feeding humanity through global food trade, *Earth's Futur* 2 (2014) 458–469.
- [2] C. Schade, D. Pimentel, Population crash: prospects for famine in the twenty-first century, *Environ. Dev. Sustain.* 12 (2010) 245–262.
- [3] H.C.J. Godfray, J.R. Beddington, I.R. Crute, L. Haddad, D. Lawrence, J.F. Muir, J. Pretty, S. Robinson, S.M. Thomas, C. Toulmin, Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People, *Science* 327 (2010) 812–818.
- [4] DESA, World Population 2012, New York (USA), 2012.
- [5] FAO, The State of World Fisheries and Aquaculture 2014, Rome (Italy), 2014.
- [6] F. Asche, Farming the sea, *Mar. Resour. Econ.* 23 (2008) 527–547.
- [7] FAO, The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals, 2018.
- [8] D. Pauly, V. Christensen, J. Dalsgaard, R. Froese, F.J. Torres, Fishing down marine food webs, *Science* 279 (1998) 860–863.
- [9] B. Worm, E.B. Barbier, N. Beaumont, J.E. Duffy, C. Folke, B.S. Halpern, J.B.C. Jackson, H.K. Lotze, F. Micheli, S.R. Palumbi, E. Sala, K. a Selkoe, J.J. Stachowicz, R. Watson, Impacts of biodiversity loss on ocean ecosystem services, *Science* 314 (2006) 787–790.
- [10] D.R. Tocher, Issues surrounding fish as a source of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids, *Lipid Technol.* 21 (2009) 13–16.
- [11] R.L. Naylor, R.W. Hardy, D.P. Bureau, A. Chiu, M. Elliott, A.P. Farrell, I. Forster, D.M. Gatlin, R.J. Goldberg, K. Hua, P.D. Nichols, Feeding aquaculture in an era of finite resources, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 15103–15110.
- [12] M.D. Smith, C.A. Roheim, L.B. Crowder, B.S. Halpern, M. Turnipseed, J.L. Anderson, F. Asche, L. Bourillón, A.G. Guttormsen, A. Khan, L.A. Liguori, A. McNevin, M.I. O'Connor, D. Squires, P. Tyedmers, C. Brownstein, K. Carden, D.H. Klinger, R. Sagarin, K.A. Selkoe, Sustainability and global seafood, *Science* 327 (2010) 784–786.
- [13] R.L. Naylor, R.J. Goldberg, J.H. Primavera, N. Kautsky, M.C. Beveridge, J. Clay, C. Folke, J. Lubchenco, H. Mooney, M. Troell, Effect of aquaculture on world fish supplies, *Nature* 405 (2000) 1017–1024.
- [14] J.H. Tidwell, G.L. Allan, Fish as food: aquaculture's contribution. Ecological and economic impacts and contributions of fish farming and capture fisheries, *EMBO Rep.* 2 (2001) 958–963.
- [15] J.R. Sargent, A.G.J. Tacon, Development of farmed fish: a nutritionally necessary alternative to meat, *Proc. Nutr. Soc.* 58 (1999) 377–383.
- [16] C.M. Duarte, M. Holmer, Y. Olsen, D. Soto, N. Marbà, J. Guiu, K. Black, I. Karakassis, Will the Oceans Help Feed Humanity?, *Bioscience* 59 (2009) 967–976.
- [17] G. Corraze, S. Kaushik, Alimentation lipidique et remplacement des huiles de poisson par des huiles végétales en pisciculture, *Cah. Agric.* 18 (2009) 112–118.
- [18] J.G. Wallis, J.L. Watts, J. Browse, Polyunsaturated fatty acid synthesis: what will they think of next?, *Trends Biochem. Sci.* 27 (2002) 467.
- [19] D.R. Tocher, Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective, *Aquaculture* 449 (2015) 94–107.
- [20] M. Vagner, E. Santigosa, Characterization and modulation of gene expression and enzymatic activity of delta-6 desaturase in teleosts: A review, *Aquaculture* 315 (2011) 131–143.

- [21] B.D. Glencross, Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species, *Rev. Aquac.* 1 (2009) 71–124.
- [22] G. Lenihan-Geels, K.S. Bishop, L.R. Ferguson, Alternative sources of omega-3 fats: Can we find a sustainable substitute for fish?, *Nutrients* 5 (2013) 1301–1315.
- [23] J.R. Sargent, D.R. Tocher, J.G. Bell, The Lipids, in: J.E. Halver, R.W. Hardy (Eds.), *Fish Nutr.*, 3rd Revise, Academic Press Inc, 2002: pp. 181–257.
- [24] E. Henrotte, D. Kpogue, S.N.M. Mandiki, N. Wang, J. Douxfils, J. Dick, D. Tocher, P. Kestemont, n-3 and n-6 fatty acid bioconversion abilities in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) at two developmental stages, *Aquac. Nutr.* 17 (2011) e216–e225.
- [25] X. Xu, P. Kestemont, Lipid metabolism and FA composition in tissues of Eurasian perch *Perca fluviatilis* as influenced by dietary fats, *Lipids* 37 (2002) 297–304.
- [26] P. Fontaine, L'élevage de la perche commune, une voie de diversification pour l'aquaculture continentale, *INRA Prod Anim.* 17 (2004) 189–193.
- [27] P. Fontaine, Développement de la pisciculture continentale européenne et domestication de nouvelles espèces, *Cah. Agric.* 18 (2009) 144–147.
- [28] X. Xu, P. Fontaine, C. Mélard, P. Kestemont, Effects of dietary fat levels on growth, feed efficiency and biochemical compositions of Eurasian perch *Perca fluviatilis*, *Aquac. Int.* 9 (2001) 437–449.
- [29] G. Blanchard, J.G. Makombu, P. Kestemont, Influence of different dietary 18:3n-3/18:2n-6 ratio on growth performance, fatty acid composition and hepatic ultrastructure in Eurasian perch, *Perca fluviatilis*, *Aquaculture* 284 (2008) 144–150.
- [30] R.E. Broughton, R. Betancur-R., C. Li, G. Arratia, G. Ortí, Multi-locus phylogenetic analysis reveals the pattern and tempo of bony fish evolution, *PLoS Curr. Tree Life* (2013) 1–32.
- [31] C.A. Stepien, A.E. Haponski, Taxonomy, Distribution, and Evolution of the Percidae, in: P. Kestemont, K. Dabrowski, R. Summerfelt (Eds.), *Biol. Cult. Percid Fishes Princ. Pract.*, Springer, 2015: pp. 3–60.
- [32] S.F. O'Keefe, Nomenclature and Classification of Lipids, in: C.C. Akoh, D.B. Min (Eds.), *Food Lipids Chem. Nutr. Biotechnol.*, Second Edition, Marcel Dekker, Inc., New York (USA), 2002: pp. 19–58.
- [33] I. Gill, R. Valivety, Polyunsaturated fatty acids, part 1: Occurrence, biological activities and applications, *TIBTECH.* 15 (1997) 401–409.
- [34] H.W. Cook, C.R. McMaster, Fatty acid desaturation and chain elongation in eukaryotes, in: D. Vance, J. Vance (Eds.), *Biochem. Lipids, Lipoproteins Membr.*, 4th Edition, Elsevier Science B.V., 2002: pp. 181–204.
- [35] S.M. Watkins, J.B. German, Unsaturated Fatty Acids, in: C.C. Akoh, D.B. Min (Eds.), *Food Lipids Chem. Nutr. Biotechnol.*, Second Edition, Marcel Dekker, Inc., New York (USA), 2002: pp. 577–606.
- [36] D.R. Tocher, Metabolism and Function of Lipids and Fatty Acids in Teleost Fish, *Rev. Fish. Sci.* 11 (2003) 107–184.
- [37] P.L. Yeagle, Lipids, *ELS* (2014) 1–9.
- [38] K. Bouarab, F. Adas, E. Gaquerel, B. Kloareg, J.-P. Salaün, P. Potin, The Innate Immunity of a Marine Red Alga Involves Oxylipins from Both the Eicosanoid and Octadecanoid Pathways, *Plant Physiol.* 135 (2004) 1838–1848.
- [39] A. Andreou, F. Brodhun, I. Feussner, Biosynthesis of oxylipins in non-mammals, *Prog. Lipid Res.* 48 (2009) 148–170.
- [40] A.A. Spector, Essentiality of fatty acids, *Lipids* 34 (1999) S1–S3.
- [41] C.D. Funk, Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology, *Science* 294 (2001) 1871–1875.
- [42] P.C. Calder, Mechanisms of action of (n-3) fatty acids, *J. Nutr.* 142 (2012) 592S–599S.
- [43] P.C. Calder, Very long chain omega-3 (n-3) fatty acids and human health, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 116 (2014) 1280–1300.

- [44] D.A. Toke, C.E. Martin, Isolation and Characterization of a Gene Affecting Fatty Acid Elongation in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 18413–18422.
- [45] L.F.C. Castro, D.R. Tocher, O. Monroig, Long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in chordates: Insights into the evolution of Fads and Elovl gene repertoire, *Prog. Lipid Res.* 62 (2016) 25–40.
- [46] T. Maier, S. Jenni, N. Ban, Architecture of Mammalian Fatty Acid Synthase at 4.5 Å Resolution, *Science* 311 (2006) 1258–1262.
- [47] S. Smith, The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes, *FASEB J.* 8 (1994) 1248–1259.
- [48] H. Guillou, D. Zadavec, P.G. Martin, A. Jacobsson, The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice, *Prog. Lipid Res.* 49 (2010) 186–199.
- [49] A.E. Leonard, S.L. Pereira, H. Sprecher, Y.-S. Huang, Elongation of long-chain fatty acids, *Prog. Lipid Res.* 43 (2004) 36–54.
- [50] D.R. Tocher, M.J. Leaver, P. a Hodgson, Recent advances in the biochemistry and molecular biology of fatty acyl desaturases, *Prog. Lipid Res.* 37 (1998) 73–117.
- [51] Y. Ohno, S. Suto, M. Yamanaka, Y. Mizutani, S. Mitsutake, Y. Igarashi, T. Sassa, A. Kihara, ELOVL1 production of C24 acyl-CoAs is linked to C24 sphingolipid synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 18439–18444.
- [52] Ó. Monroig, D.R. Tocher, J.C. Navarro, Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in marine invertebrates: Recent advances in molecular mechanisms, *Mar. Drugs* 11 (2013) 3998–4018.
- [53] A.D. Uttaro, Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in lower eukaryotes, *IUBMB Life* 58 (2006) 563–571.
- [54] J.A. Napier, Plumbing the depths of PUFA biosynthesis: a novel polyketide synthase-like pathway from marine organisms, *Trends Plant Sci.* 7 (2002) 51–54.
- [55] J.G. Metz, P. Roessler, D. Facciotti, C. Levering, F. Dittrich, M. Lassner, R. Valentine, K. Lardizabal, F. Domergue, A. Yamada, K. Yazawa, V. Knauf, J. Browse, Production of Polyunsaturated Fatty Acids by Polyketide Synthases in Both Prokaryotes and Eukaryotes, *Science* 293 (2001) 290–294.
- [56] A. Hauvermale, J. Kuner, B. Rosenzweig, D. Guerra, S. Diltz, J. Metz, Fatty Acid Production in *Schizochytrium* sp.: Involvement of a Polyunsaturated Fatty Acid Synthase and a Type I Fatty Acid Synthase, *Lipids* 41 (2006) 739–747.
- [57] S.L. Pereira, A.E. Leonard, P. Mukerji, Recent advances in the study of fatty acid desaturases from animals and lower eukaryotes, *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids* 68 (2003) 97–106.
- [58] T. Okayasu, M. Nagao, T. Ishibashi, Y. Imai, Purification and partial characterization of linoleoyl-CoA desaturase from rat liver microsomes, *Arch. Biochem. Biophys.* 206 (1981) 21–28.
- [59] P. Sperling, E. Heinz, Desaturases fused to their electron donor, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 103 (2001) 158–180.
- [60] H. Sprecher, Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids, *Biochim. Biophys. Acta* 1486 (2000) 219–231.
- [61] M.J. Leaver, J.M. Bautista, B.T. Björnsson, E. Jönsson, G. Krey, D.R. Tocher, B.E. Torstensen, Towards Fish Lipid Nutrigenomics: Current State and Prospects for Fin-Fish Aquaculture, *Rev. Fish. Sci.* 16 (2008) 73–94.
- [62] M. V Bell, D.R. Tocher, Biosynthesis of Polyunsaturated Fatty Acids in Aquatic Ecosystems: General Pathways and New Directions, in: M. Kainz, M.T. Brett, M.T. Arts (Eds.), *Lipids Aquat. Ecosyst.*, Springer New York, New York, NY, 2008: pp. 211–236.
- [63] J.L. Harwood, I.A. Guschina, The versatility of algae and their lipid metabolism, *Biochimie* 91 (2009) 679–684.
- [64] R.J. Henderson, M.T. Park, J.R. Sargent, The desaturation and elongation of ¹⁴C-labelled polyunsaturated fatty acids by pike (*Esox lucius* L.) in vivo, *Fish Physiol. Biochem.* 14 (1995) 223–235.

- [65] C. Ghioni, D.R. Tocher, M. V Bell, J.R. Dick, J.R. Sargent, Low C18 to C20 fatty acid elongase activity and limited conversion of stearidonic acid, 18:4 (n-3), to eicosapentaenoic acid, 20:5 (n-3), in a cell line from the turbot, *Scophthalmus maximus*, *Biochim. Biophys. Acta* 1437 (1999) 170–181.
- [66] D.R. Tocher, C. Ghioni, Fatty acid metabolism in marine fish: low activity of fatty acyl delta5 desaturation in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cells, *Lipids* 34 (1999) 433–440.
- [67] N. Ruiz-López, O. Sayanova, J.A. Napier, R.P. Haslam, Metabolic engineering of the omega-3 long chain polyunsaturated fatty acid biosynthetic pathway into transgenic plants, *J. Exp. Bot.* 63 (2012) 2397–2410.
- [68] N. Tejera, D. Vauzour, M.B. Betancor, O. Sayanova, S. Usher, M. Cochard, N. Rigby, N. Ruiz-Lopez, D. Menoyo, D.R. Tocher, J.A. Napier, A.M. Minihane, A Transgenic *Camelina sativa* Seed Oil Effectively Replaces Fish Oil as a Dietary Source of Eicosapentaenoic Acid in Mice, *J. Nutr.* 146 (2016) 227–235.
- [69] M. Sprague, M.B. Betancor, D.R. Tocher, Microbial and genetically engineered oils as replacements for fish oil in aquaculture feeds, *Biotechnol. Lett.* 39 (2017) 1599–1609.
- [70] D. Los, N. Murata, Structure and expression of fatty acid desaturases, *Biochim. Biophys. Acta* 1394 (1998) 3–15.
- [71] K. Hashimoto, A.C. Yoshizawa, S. Okuda, K. Kuma, S. Goto, M. Kanehisa, The repertoire of desaturases and elongases reveals fatty acid variations in 56 eukaryotic genomes, *J. Lipid Res.* 49 (2008) 183–191.
- [72] K. Hashimoto, A.C. Yoshizawa, K. Saito, T. Yamada, M. Kanehisa, The repertoire of desaturases for unsaturated fatty acid synthesis in 397 genomes, *Genome Informatics* 17 (2006) 173–183.
- [73] D. López Alonso, F. García-Maroto, J. Rodríguez-Ruiz, J. a. Garrido, M. a. Vilches, Evolution of the membrane-bound fatty acid desaturases, *Biochem. Syst. Ecol.* 31 (2003) 1111–1124.
- [74] J. Shanklin, C. Somerville, Stearoyl-acyl-carrier-protein desaturase from higher plants is structurally unrelated to the animal and fungal homologs, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88 (1991) 2510–2514.
- [75] P. Sperling, P. Ternes, T.K. Zank, E. Heinz, The evolution of desaturases, *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids* 68 (2003) 73–95.
- [76] D. Meesapyodsuk, X. Qiu, The front-end desaturase: structure, function, evolution and biotechnological use, *Lipids* 47 (2012) 227–237.
- [77] A. Jaya-Ram, S.D. Ishak, Y.-L. Enyu, M.-K. Kuah, K.-L. Wong, A.C. Shu-Chien, Molecular cloning and ontogenic mRNA expression of fatty acid desaturase in the carnivorous striped snakehead fish (*Channa striata*), *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 158 (2011) 415–22.
- [78] M.-K. Kuah, A. Jaya-Ram, A.C. Shu-Chien, The capacity for long-chain polyunsaturated fatty acid synthesis in a carnivorous vertebrate: Functional characterisation and nutritional regulation of a Fads2 fatty acyl desaturase with $\Delta 4$ activity and an Elovl5 elongase in striped snakehead (*Channa striata*), *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1851 (2015) 248–260.
- [79] H. Ren, J. Yu, P. Xu, Y. Tang, Influence of dietary fatty acids on muscle fatty acid composition and expression levels of D6 desaturase-like and Elovl5-like elongase in common carp (*Cyprinus carpio* var. Jian), *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 163 (2012) 184–192.
- [80] H. Ren, G. Zhang, J. Li, Y. Tang, H. Li, J. Yu, P. Xu, Two D6-desaturase-like genes in common carp (*Cyprinus carpio* var. Jian): Structure characterization, mRNA expression, temperature and nutritional regulation, *Gene* 525 (2013) 11–17.
- [81] I. Seiliez, S. Panserat, S. Kaushik, P. Bergot, Cloning, tissue distribution and nutritional regulation of a Delta6-desaturase-like enzyme in rainbow trout, *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 130 (2001) 83–93.
- [82] Y.-F. Song, Z. Luo, Y.-X. Pan, L.-H. Zhang, Q.-L. Chen, J.-L. Zheng, Three unsaturated fatty acid biosynthesis-related genes in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*: Molecular characterization, tissue expression and transcriptional regulation by leptin, *Gene* 563 (2015) 1–9.
- [83] A. Rasal, S. Roy, R.S. Rana, S. Murali, G. Krishna, S. Gupta, P. Gireesh-Babu, Molecular cloning and nutritional regulation of putative $\Delta 6$ desaturase mRNA from striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*), *Aquaculture* 451 (2016) 413–420.

- [84] N.K. Abdul Hamid, G. Carmona-Antoñanzas, Ó. Monroig, D.R. Tocher, G.M. Turchini, J.A. Donald, Isolation and Functional Characterisation of a fads2 in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) with $\Delta 5$ Desaturase Activity, *PLoS One* 11 (2016) 1–16.
- [85] S.H. Kim, J.B. Kim, S.Y. Kim, K.H. Roh, H.U. Kim, K.-R. Lee, Y.S. Jang, M. Kwon, J.S. Park, Functional characterization of a delta 6-desaturase gene from the black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*), *Biotechnol. Lett.* 33 (2011) 1185–1193.
- [86] D. Xie, F. Chen, S. Lin, S. Wang, C. You, Ó. Monroig, D.R. Tocher, Y. Li, Cloning, functional characterization and nutritional regulation of $\Delta 6$ fatty acyl desaturase in the herbivorous euryhaline teleost *Scatophagus argus*, *PLoS One* 9 (2014) 1–10.
- [87] Y. Huang, Z. Lin, H. Rong, M. Hao, W. Zou, S. Li, X. Wen, Cloning, tissue distribution, functional characterization and nutritional regulation of $\Delta 6$ fatty acyl desaturase in chu's croaker *Nibea coibor*, *Aquaculture* 479 (2017) 208–216.
- [88] N. Kabeya, Y. Yamamoto, S.F. Cummins, A. Elizur, R. Yazawa, Y. Takeuchi, Y. Haga, S. Satoh, G. Yoshizaki, Polyunsaturated fatty acid metabolism in a marine teleost, Nibe croaker *Nibea mitsukurii*: Functional characterization of Fads2 desaturase and Elovl5 and Elovl4 elongases, *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 188 (2015) 37–45.
- [89] N. Kabeya, M. Chiba, Y. Haga, S. Satoh, G. Yoshizaki, Cloning and functional characterization of fads2 desaturase and elovl5 elongase from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*, *Comp. Biochem. Physiol. Part B.* 214 (2017) 36–46.
- [90] A. González-Rovira, G. Mourente, X. Zheng, D.R. Tocher, C. Pendón, Molecular and functional characterization and expression analysis of a $\Delta 6$ fatty acyl desaturase cDNA of European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.), *Aquaculture* 298 (2009) 90–100.
- [91] E. Santigosa, F. Geay, T. Tonon, H. Le Delliou, H. Kuhl, R. Reinhardt, L. Corcos, C. Cahu, J.L. Zambonino-Infante, D. Mazurais, Cloning, tissue expression analysis, and functional characterization of two $\Delta 6$ -desaturase variants of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.), *Mar. Biotechnol.* 13 (2011) 22–31.
- [92] D.R. Tocher, X. Zheng, C. Schlechtriem, N. Hastings, J.R. Dick, A.J. Teale, Highly unsaturated fatty acid synthesis in marine fish: cloning, functional characterization, and nutritional regulation of fatty acyl delta 6 desaturase of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.), *Lipids* 41 (2006) 1003–1016.
- [93] R. Zuo, K. Mai, W. Xu, X. Dong, Q. Ai, Molecular cloning, tissue distribution and nutritional regulation of a $\Delta 6$ -fatty acyl desaturase-like enzyme in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*), *Aquac. Res.* (2014) 1–15.
- [94] S.H. Kim, K.H. Roh, J.-B. Kim, K.-S. Kim, N.S. Kim, H.U. Kim, K.-R. Lee, J.-S. Park, J.-B. Kim, Isolation and functional characterization of a delta 6-desaturase gene from the pike eel (*Muraenesox cinereus*), *J. Microbiol.* 51 (2013) 807–813.
- [95] Y. Yamamoto, N. Kabeya, Y. Takeuchi, Y. Haga, S. Satoh, T. Takeuchi, G. Yoshizaki, Cloning and nutritional regulation of polyunsaturated fatty acid desaturase and elongase of a marine teleost, the nibe croaker *Nibea mitsukurii*, *Fish. Sci.* 76 (2010) 463–472.
- [96] X. Zheng, Z. Ding, Y. Xu, O. Monroig, S. Morais, D.R. Tocher, Physiological roles of fatty acyl desaturases and elongases in marine fish: Characterisation of cDNAs of fatty acyl $\Delta 6$ desaturase and elovl5 elongase of cobia (*Rachycentron canadum*), *Aquaculture* 290 (2009) 122–131.
- [97] S. Morais, G. Mourente, A. Ortega, J. a. Tocher, D.R. Tocher, Expression of fatty acyl desaturase and elongase genes, and evolution of DHA:EPA ratio during development of unfed larvae of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L.), *Aquaculture* 313 (2011) 129–139.
- [98] Ó. Monroig, D.R. Tocher, F. Hontoria, J.C. Navarro, Functional characterisation of a Fads2 fatty acyl desaturase with $\Delta 6/\Delta 8$ activity and an Elovl5 with C16, C18 and C20 elongase activity in the anadromous teleost meagre (*Argyrosomus regius*), *Aquaculture* 412–413 (2013) 14–22.
- [99] X. Zheng, D.R. Tocher, C. a Dickson, J.G. Bell, A.J. Teale, Highly unsaturated fatty acid synthesis in vertebrates: new insights with the cloning and characterization of a delta6 desaturase of Atlantic salmon, *Lipids* 40 (2005) 13–24.

- [100] O. Monroig, X. Zheng, S. Morais, M.J. Leaver, J.B. Taggart, D.R. Tocher, Multiple genes for functional 6 fatty acyl desaturases (Fad) in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): gene and cDNA characterization, functional expression, tissue distribution and nutritional regulation, *Biochim. Biophys. Acta* 1801 (2010) 1072–1081.
- [101] S. Wang, Ó. Monroig, G. Tang, L. Zhang, C. You, D.R. Tocher, Y. Li, Investigating long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in teleost fish: Functional characterization of fatty acyl desaturase (Fads2) and Elovl5 elongase in the catadromous species, Japanese eel *Anguilla japonica*, *Aquaculture* 434 (2014) 57–65.
- [102] N.Y. Mohd-Yusof, O. Monroig, A. Mohd-Adnan, K.-L. Wan, D.R. Tocher, Investigation of highly unsaturated fatty acid metabolism in the Asian sea bass, *Lates calcarifer*, *Fish Physiol. Biochem.* 36 (2010) 827–843.
- [103] N. Hastings, M.K. Agaba, D.R. Tocher, X. Zheng, C. a Dickson, J.R. Dick, A.J. Teale, Molecular cloning and functional characterization of fatty acyl desaturase and elongase cDNAs involved in the production of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from alpha-linolenic acid in Atlantic salmon (*Salmo salar*), *Mar. Biotechnol.* 6 (2005) 463–474.
- [104] S. Morais, F. Castanheira, L. Martinez-Rubio, L.E.C. Conceição, D.R. Tocher, Long chain polyunsaturated fatty acid synthesis in a marine vertebrate: Ontogenetic and nutritional regulation of a fatty acyl desaturase with $\Delta 4$ activity, *Biochim. Biophys. Acta* 1821 (2012) 660–671.
- [105] Y. Li, O. Monroig, L. Zhang, S. Wang, X. Zheng, J.R. Dick, C. You, D.R. Tocher, Vertebrate fatty acyl desaturase with $\Delta 4$ activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 16840–1685.
- [106] M.-K. Kuah, A. Jaya-Ram, A.C. Shu-Chien, A fatty acyl desaturase (fads2) with dual $\Delta 6$ and $\Delta 5$ activities from the freshwater carnivorous striped snakehead *Channa striata*, *Comp. Biochem. Physiol. Part A* 201 (2016) 146–155.
- [107] J. Fonseca-Madrugal, J.C. Navarro, F. Hontoria, D.R. Tocher, C. a. Martinez-Palacios, O. Monroig, Diversification of substrate specificities in teleostei Fads2: characterization of D4 and D6D5 desaturases of *Chirostoma estor*, *J. Lipid Res.* 55 (2014) 1408–1419.
- [108] O. Monroig, J. Rotllant, E. Sánchez, J.M. Cerdá-Reverter, D.R. Tocher, Expression of long-chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA) biosynthesis genes during zebrafish *Danio rerio* early embryogenesis, *Biochim. Biophys. Acta* 1791 (2009) 1093–1101.
- [109] S. Tanomman, M. Ketudat-Cairns, A. Jangprai, S. Boonanuntanasarn, Characterization of fatty acid delta-6 desaturase gene in Nile tilapia and heterogenous expression in *Saccharomyces cerevisiae*, *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 166 (2013) 148–156.
- [110] Y.-Y. Li, C.-B. Hu, Y.-J. Zheng, X.-A. Xia, W.-J. Xu, S.-Q. Wang, W.-Z. Chen, Z.-W. Sun, J.-H. Huang, The effects of dietary fatty acids on liver fatty acid composition and Delta(6)-desaturase expression differ with ambient salinities in *Siganus canaliculatus*, *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 151 (2008) 183–190.
- [111] M. Lopes-Marques, R. Ozório, R. Amaral, D.R. Tocher, Ó. Monroig, L.F.C. Castro, Molecular and functional characterization of a fads2 orthologue in the Amazonian teleost, *Arapaima gigas*, *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 203 (2017) 84–91.
- [112] W.-C. Tu, R.J. Cook-Johnson, M.J. James, B.S. Mühlhäusler, D. a J. Stone, R. a Gibson, Barramundi (*Lates calcarifer*) desaturase with $\Delta 6/\Delta 8$ dual activities, *Biotechnol. Lett.* 34 (2012) 1283–1296.
- [113] X. Zheng, I. Seiliez, N. Hastings, D.R. Tocher, S. Panerlat, C. a Dickson, P. Bergot, a J. Teale, Characterization and comparison of fatty acyl Delta6 desaturase cDNAs from freshwater and marine teleost fish species, *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 139 (2004) 269–279.
- [114] O. Monroig, Y. Li, D.R. Tocher, Delta-8 desaturation activity varies among fatty acyl desaturases of teleost fish: high activity in delta-6 desaturases of marine species, *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 159 (2011) 206–213.
- [115] T.M. Haslam, L. Kunst, Extending the story of very-long-chain fatty acid elongation, *Plant Sci.* 210 (2013) 93–107.
- [116] A. Kihara, Very long-chain fatty acids: elongation, physiology and related disorders, *J. Biochem.* 152 (2012) 387–395.

- [117] X. Xue, C.Y. Feng, S.M. Hixson, K. Johnstone, D.M. Anderson, C.C. Parrish, M.L. Rise, Characterization of the fatty acyl elongase (elovl) gene family, and hepatic elovl and delta-6 fatty acyl desaturase transcript expression and fatty acid responses to diets containing camelina oil in Atlantic cod (*Gadus morhua*), *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 175 (2014) 9–22.
- [118] Ó. Monroig, M. Lopes-Marques, J.C. Navarro, F. Hontoria, R. Ruivo, M.M. Santos, B. Venkatesh, D.R. Tocher, L.F. C. Castro, Evolutionary functional elaboration of the Elov2/5 gene family in chordates, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1–10.
- [119] A. Jakobsson, R. Westerberg, A. Jacobsson, Fatty acid elongases in mammals: Their regulation and roles in metabolism, *Prog. Lipid Res.* 45 (2006) 237–249.
- [120] O. Monroig, J. Rotllant, J.M. Cerdá-Reverter, J.R. Dick, A. Figueras, D.R. Tocher, Expression and role of Elov4 elongases in biosynthesis of very long-chain fatty acids during zebrafish *Danio rerio* early embryonic development, *Biochim. Biophys. Acta* 1801 (2010) 1145–1154.
- [121] M. Agaba, D.R. Tocher, C. a Dickson, J.R. Dick, A.J. Teale, Zebrafish cDNA encoding multifunctional Fatty Acid elongase involved in production of eicosapentaenoic (20:5n-3) and docosahexaenoic (22:6n-3) acids, *Mar. Biotechnol.* 6 (2004) 251–261.
- [122] S.-H. Tan, H.-H. Chung, A.C. Shu-Chien, Distinct developmental expression of two elongase family members in zebrafish, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 393 (2010) 397–403.
- [123] G. Carmona-Antoñanzas, D.R. Tocher, J.B. Taggart, M.J. Leaver, An evolutionary perspective on Elov5 fatty acid elongase: comparison of Northern pike and duplicated paralogs from Atlantic salmon, *BMC Evol. Biol.* 13 (2013) 85–97.
- [124] A. Meyer, H. Kirsch, F. Domergue, A. Abbadi, P. Sperling, J. Bauer, P. Cirpus, T.K. Zank, H. Moreau, T.J. Roscoe, U. Zähringer, E. Heinz, Novel fatty acid elongases and their use for the reconstitution of docosahexaenoic acid biosynthesis, *J. Lipid Res.* 45 (2004) 1899–1909.
- [125] M.K. Gregory, M.J. James, Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Elov5 and Elov2 differ in selectivity for elongation of omega-3 docosapentaenoic acid, *BBA Mol. Cell Biol. Lipids* 1841 (2014) 1656–1660.
- [126] M.K. Gregory, V.H.L. See, R.A. Gibson, K.A. Schuller, Cloning and functional characterisation of a fatty acyl elongase from southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii*), *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 155 (2010) 178–185.
- [127] Ó. Monroig, K. Webb, L. Ibarra-Castro, G.J. Holt, D.R. Tocher, Biosynthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids in marine fish: Characterization of an Elov4-like elongase from cobia *Rachycentron canadum* and activation of the pathway during early life stages, *Aquaculture* 312 (2011) 145–153.
- [128] S.H. Kim, S.Y. Kim, E.K. Kim, K.H. Roh, J.-B. Kim, K.-S. Kim, H.U. Kim, K.-R. Lee, H.-C. Kang, J.-S. Park, K.H. Kim, J.-B. Kim, Identification and functional characterization of polyunsaturated fatty acid elongase (McELOVL5) gene from pike eel (*Muraenesox cinereus*), *Biotechnol. Lett.* 36 (2014) 29–37.
- [129] S. Li, Y. Yuan, T. Wang, W. Xu, M. Li, K. Mai, Q. Ai, Molecular Cloning, Functional Characterization and Nutritional Regulation of the Putative Elongase Elov5 in the Orange-Spotted Grouper (*Epinephelus coioides*), *PLoS One* 11 (2016) 1–19.
- [130] S.H. Kim, J.B. Kim, Y.S. Jang, S.Y. Kim, K.H. Roh, H.U. Kim, K.-R. Lee, J.-S. Park, Isolation and functional characterization of polyunsaturated fatty acid elongase (AsELOVL5) gene from black seabream (*Acanthopagrus schlegelii*), *Biotechnol. Lett.* 34 (2012) 261–268.
- [131] R. Zuo, K. Mai, W. Xu, X. Dong, Q. Ai, Molecular cloning, tissue distribution and nutritional regulation of a fatty acyl elov5-like elongase in large yellow croaker, *Larimichthys crocea*, *Aquac. Res.* (2015) 1–14.
- [132] Ó. Monroig, S. Wang, L. Zhang, C. You, D.R. Tocher, Y. Li, Elongation of long-chain fatty acids in rabbitfish *Siganus canaliculatus*: Cloning, functional characterisation and tissue distribution of Elov5- and Elov4-like elongases, *Aquaculture* 350–353 (2012) 63–70.
- [133] Alimuddin, V. Kiron, S. Satoh, T. Takeuchi, G. Yoshizaki, Cloning and over-expression of a masu salmon (*Oncorhynchus masou*) fatty acid elongase-like gene in zebrafish, *Aquaculture*. 282 (2008) 13–18.
- [134] S. Morais, O. Monroig, X. Zheng, M.J. Leaver, D.R. Tocher, Highly unsaturated fatty acid synthesis in Atlantic salmon: characterization of ELOVL5- and ELOVL2-like elongases, *Mar. Biotechnol.* 11 (2009) 627–639.

- [135] G. Carmona-Antoñanzas, Ó. Monroig, J.R. Dick, A. Davie, D.R. Tocher, Biosynthesis of very long-chain fatty acids (C>24) in Atlantic salmon: Cloning, functional characterisation, and tissue distribution of an Elovl4 elongase, *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 159 (2011) 122–129.
- [136] W.-C. Tu, B.S. Mühlhäusler, M.J. James, D. a J. Stone, R. a Gibson, An alternative n-3 fatty acid elongation pathway utilising 18:3n-3 in barramundi (*Lates calcarifer*), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 423 (2012) 176–182.
- [137] M.K. Agaba, D.R. Tocher, X. Zheng, C. a Dickson, J.R. Dick, A.J. Teale, Cloning and functional characterisation of polyunsaturated fatty acid elongases of marine and freshwater teleost fish, *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 142 (2005) 342–352.
- [138] D.R. Tocher, M. Agaba, N. Hastings, J.G. Bell, J.R. Dick, A.J. Teale, Nutritional regulation of hepatocyte fatty acid desaturation and polyunsaturated fatty acid composition in zebrafish (*Danio rerio*) and tilapia (*Oreochromis niloticus*), *Fish Physiol. Biochem.* 24 (2002) 309–320.
- [139] S. Morais, G. Mourente, A. Martínez, N. Gras, D.R. Tocher, Docosahexaenoic acid biosynthesis via fatty acyl elongase and $\Delta 4$ -desaturase and its modulation by dietary lipid level and fatty acid composition in a marine vertebrate, *Biochim. Biophys. Acta* 1851 (2015) 588–597.
- [140] D.S. Francis, D.J. Peters, G.M. Turchini, Apparent in Vivo $\Delta 6$ Desaturase Activity, Efficiency, and Affinity Are Affected by Total Dietary C 18 PUFA in the Freshwater Fish Murray Cod, *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) 4381–4390.
- [141] A. Jaya-Ram, M.-K. Kuah, P.-S. Lim, S. Kolkovski, A.C. Shu-Chien, In fluence of dietary HUFA levels on reproductive performance, tissue fatty acid profile and desaturase and elongase mRNAs expression in female zebra fish *Danio rerio*, *Aquaculture* 277 (2008) 275–281.
- [142] K. Mjoun, K.A. Rosentrater, M.L. Brown, Culture performance and tissue fatty acid compositions of yellow perch (*Perca flavescens*) fed different dietary lipids, *Aquaculture* 360–361 (2012) 17–24.
- [143] T. Thanuthong, D.S. Francis, E. Manickam, S.D. Senadheera, D. Cameron-Smith, G.M. Turchini, Fish oil replacement in rainbow trout diets and total dietary PUFA content: II) Effects on fatty acid metabolism and in vivo fatty acid bioconversion, *Aquaculture* 322–323 (2011) 99–108.
- [144] W.-C. Tu, B.S. Mühlhäusler, M.J. James, D.A. Stone, R.A. Gibson, Dietary alpha-linolenic acid does not enhance accumulation of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in barramundi (*Lates calcarifer*), *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 164 (2013) 29–37.
- [145] C.-Y. Teoh, G.M. Turchini, W.-K. Ng, Genetically improved farmed Nile tilapia and red hybrid tilapia showed differences in fatty acid metabolism when fed diets with added fish oil or a vegetable oil blend, *Aquaculture* 312 (2011) 126–136.
- [146] M.S. Thomassen, D. Rein, G.M. Berge, T.-K. Østbye, B. Ruyter, High dietary EPA does not inhibit $\Delta 5$ and $\Delta 6$ desaturases in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed rapeseed oil diets, *Aquaculture* 360–361 (2012) 78–85.
- [147] G.M. Turchini, D.S. Francis, R.S. Keast, A.J. Sinclair, Transforming salmonid aquaculture from a consumer to a producer of long chain omega-3 fatty acids, *Food Chem.* 124 (2011) 609–614.
- [148] H. Asuman, G. Corraze, S. Panserat, O. Tufan, Effects of alternate feeding with different lipid sources on fatty acid composition and bioconversion in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*), *Aquaculture* 464 (2016) 28–36.
- [149] S.H. Lee, J.L. Stephens, K.S. Paul, P.T. Englund, Fatty acid synthesis by elongases in trypanosomes, *Cell* 126 (2006) 691–699.
- [150] E. Sakuradani, Advances in the Production of Various Polyunsaturated Fatty Acids through Oleaginous Fungus *Mortierella alpina* Breeding, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74 (2010) 908–917.
- [151] W.L. Roelofs, W. Liu, G. Hao, H. Jiao, A.P. Rooney, C.E.J. Linn, Evolution of moth sex pheromones via ancestral genes, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99 (2002) 13621–13626.
- [152] D.J. Schultz, E.B. Cahoont, J. Shanklnt, R. Craigt, D.L. Cox-Foster, R.O. Mumma, J.I. Medford, Expression of delta-9 14:0-acyl carrier protein fatty acid desaturase gene is necessary for the production of omega-5 anacardic acids found in pest-resistant geranium (*Pelargonium xhortorum*), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 8771–8775.

- [153] T. Tonon, D. Harvey, R. Qing, Y. Li, T.R. Larson, I.A. Graham, Identification of a fatty acid delta-11-desaturase from the microalga *Thalassiosira pseudonana*, *FEBS Lett.* 563 (2004) 28–34.
- [154] A. Oboh, M.B. Betancor, D.R. Tocher, O. Monroig, Biosynthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids in the African catfish *Clarias gariepinus*: Molecular cloning and functional characterisation of fatty acyl desaturase (*fads2*) and elongase (*elovl2*) cDNAs, *Aquaculture* 462 (2016) 70–79.
- [155] H.G. Enoch, A. Catala, P. Strittmatter, Mechanism of rat liver microsomal stearyl-CoA desaturase. Studies of the substrate specificity, enzyme-substrate interactions, and the function of lipid, *J. Biol. Chem.* 251 (1976) 5095–5103.
- [156] R. Jeffcoat, P.R. Brawn, R. Safford, A.T. James, Properties of rat liver microsomal stearyl-coenzyme A desaturase, *Biochem. J.* 161 (1977) 431–437.
- [157] D. Meesapyodsuk, X. Qiu, Structure determinants for the substrate specificity of Acyl-CoA $\Delta 9$ desaturases from a marine copepod, *ACS Chem. Biol.* 9 (2014) 922–934.
- [158] W.C. Man, M. Miyazaki, K. Chu, J.M. Ntambi, Membrane topology of mouse stearyl-CoA desaturase 1, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 1251–1260.
- [159] S. Na-Ranong, K. Laoteng, P. Kittakoop, M. Tanticharoen, S. Cheevadhanarak, Targeted mutagenesis of a fatty acid delta-6-desaturase from *Mucor rouxii*: Role of amino acid residues adjacent to histidine-rich motif II, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 339 (2006) 1029–1034.
- [160] Z.L. Lim, T. Senger, P. Vrinten, Four Amino Acid Residues Influence the Substrate Chain-Length and Regioselectivity of *Siganus canaliculatus* $\Delta 4$ and $\Delta 5/6$ Desaturases, *Lipids* 49 (2014) 357–367.
- [161] J.E. Stuke, V.M. McDonough, C.E. Martin, The OLE1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the delta-9 fatty acid desaturase and can be functionally replaced by the rat stearyl-CoA desaturase gene, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 20144–20149.
- [162] C. Gostincar, M. Turk, N. Gunde-Cimerman, The evolution of fatty acid desaturases and cytochrome b5 in eukaryotes, *J. Membr. Biol.* 233 (2010) 63–72.
- [163] J.A. Napier, O. Sayanova, P. Sperling, E. Heinz, A growing family of cytochrome b5-domain fusion proteins, *Trends Plant Sci.* 4 (1999) 2–4.
- [164] J.A. Napier, L. V. Michaelson, O. Sayanova, The role of cytochrome b5 fusion desaturases in the synthesis of polyunsaturated fatty acids, *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids* 68 (2003) 135–143.
- [165] J. Shanklin, E.B. Cahoon, Desaturation and Related Modifications of Fatty Acids, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49 (1998) 611–641.
- [166] O. Sayanova, F. Beaudoin, B. Libisch, A. Castel, P.R. Shewry, J.A. Napier, Mutagenesis and heterologous expression in yeast of a plant delta6-fatty acid desaturase, *J. Exp. Bot.* 52 (2001) 1581–1585.
- [167] O. Sayanova, F. Beaudoin, B. Libisch, P. Shewry, J. Napier, Mutagenesis of the borage Delta(6) fatty acid desaturase, *Biochem. Soc. Trans.* 28 (2000) 636–638.
- [168] M. Hoffmann, E. Hornung, S. Busch, N. Kassner, P. Ternes, G.H. Braus, I. Feussner, A small membrane-peripheral region close to the active center determines regioselectivity of membrane-bound fatty acid desaturases from *Aspergillus nidulans*, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 26666–26674.
- [169] B.G. Fox, J. Shanklin, C. Somerville, E. Münck, Stearyl-acyl carrier protein delta-9 desaturase from *Ricinus communis* is a diiron-oxo protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 (1993) 2486–2490.
- [170] J. Shanklin, E. Whittle, B.G. Fox, Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase, *Biochemistry* 33 (1994) 12787–12794.
- [171] J. Joubès, S. Raffaele, B. Bourdenx, C. Garcia, J. Laroche-Traineau, P. Moreau, F. Domergue, R. Lessire, The VLCFA elongase gene family in *Arabidopsis thaliana*: Phylogenetic analysis, 3D modelling and expression profiling, *Plant Mol. Biol.* 67 (2008) 547–566.
- [172] P. Tvrdik, R. Westerberg, S. Silve, A. Asadi, A. Jakobsson, B. Cannon, G. Loison, A. Jacobsson, Role of a new mammalian gene family in the biosynthesis of very long chain fatty acids and sphingolipids, *J. Cell Biol.* 149 (2000) 707–717.
- [173] V. Denic, J.S. Weissman, A molecular caliper mechanism for determining very long-chain fatty acid length, *Cell* 130 (2007) 663–677.

- [174] P.L. Vrinten, T. Hoffman, J. Bauer, X. Qiu, Specific protein regions influence substrate specificity and product length in polyunsaturated fatty acid condensing enzymes, *Biochemistry* 49 (2010) 3879–3886.
- [175] S. Hernandez-Buquer, B.J. Blacklock, Site-directed mutagenesis of a fatty acid elongase ELO-like condensing enzyme, *FEBS Lett.* 587 (2013) 3837–3842.
- [176] S. Logan, M.-P. Agbaga, M.D. Chan, R.S. Brush, R.E. Anderson, Endoplasmic reticulum microenvironment and conserved histidines govern ELOVL4 fatty acid elongase activity, *J. Lipid Res.* 55 (2014) 698–708.

7. Webographie

- http://animaldiversity.org/accounts/Perca_fluviatilis/classification/
- <http://faostat3.fao.org>
- <http://www.arkive.org/perch/perca-fluviatilis/>
- <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/lipid/appABC.html>

CHAPITRE 2

Chapitre 2 – Objectif & stratégie

1. OBJECTIF	37
2. STRATEGIE.....	37

1. Objectif

Cette étude s'inscrit dans la problématique générale de l'approvisionnement des populations humaines en ressources alimentaires et plus spécifiquement dans celle du développement de l'aquaculture comme alternative à la pêche. Si l'étude des besoins nutritifs des différentes espèces est une thématique historique, la durabilité ou « soutenabilité » à long terme du secteur aquacole est relativement récente et porte principalement sur l'origine des aliments. Ainsi, l'apport en ressources lipidiques sous forme de farines et d'huiles d'espèces issues de la pêche à destination d'espèces issues de l'aquaculture ne manque pas de poser question quant à sa durabilité – voire à sa finalité en tant qu'alternative. Le remplacement des farines et huiles d'origine animale par des farines et huiles d'origine végétale est une solution privilégiée pour autant que la qualité de la nourriture à destination de l'alimentation humaine soit équivalente – ce qui implique de sélectionner des organismes présentant un profil nutritif similaire à celui rencontré actuellement dans les produits issus de la pêche et des méthodes d'aquaculture « traditionnelles ». Dans ce cadre, la perche commune est un bon candidat, cette espèce se révélant capable de métaboliser les acides gras présents dans les végétaux (PUFA) en acides gras essentiels d'intérêt nutritif pour l'homme (HUFA). Dans ce contexte, il est essentiel de comprendre le mécanisme d'action des enzymes impliquées dans le métabolisme des nutriments, dans le but de proposer de nouvelles formulations alimentaires ayant l'impact le plus limité possible sur la qualité d'une nourriture à destination des populations humaines.

L'objectif général de ce travail est donc la caractérisation structurale d'une désaturase de type FED et d'une élongase de type ELOVL, toutes deux impliquées dans le métabolisme lipidique de la perche commune (*Perca fluviatilis* Linnaeus, 1758), afin de déterminer les fondamentaux moléculaires sous-tendant la voie de synthèse des acides gras longs polyinsaturés (HUFA) chez les poissons et de proposer les premiers modèles structuraux et mécanistiques de ces deux familles d'enzymes chez les animaux.

2. Stratégie

La stratégie mise en place afin de caractériser ces enzymes consiste à combiner des méthodes complémentaires expérimentales et théoriques.

La partie expérimentale se base sur une approche génétique et nous permettra d'isoler et d'identifier les séquences nucléotidique et peptidique des protéines d'intérêt¹. Les bases de données ne répertorient aucune séquence de désaturase ou d'élongase provenant de *P. fluviatilis*, il sera d'abord nécessaire d'isoler celles-ci à partir d'individus élevés pour cette occasion. Une série d'amplifications des FED et ELOVL cibles sera donc réalisée via trois étapes de PCR successives afin d'obtenir *in fine* leurs séquences complètes, c'est-à-dire du codon START au codon STOP. Une fois celles-ci obtenues et après traduction des codons nucléotidiques en acides aminés, une analyse *in silico* par alignement de séquences et construction d'arbres phylogénétiques permettra l'identification des FED et ELOVL ciblées.

La partie théorique, basée sur les séquences obtenues expérimentalement, nous permettra de proposer une structure secondaire et/ou tertiaire des acteurs-clés de la synthèse des HUFA, ainsi que plusieurs modes d'interaction avec un substrat potentiel de type PUFA. Dans un premier temps, la structure secondaire sera analysée en termes de conformation (hélices α , feuillets β , ...) et d'hydropathie (localisation des domaines membranaires). Cette analyse inclura également les informations relatives à la localisation, l'adressage et l'orientation en membrane. Dans un deuxième temps, la structure tertiaire sera modélisée *in silico* à l'aide de plusieurs méthodes complémentaires de prédiction. Cette structure sera ensuite insérée dans une membrane phospholipidique et finalement testée d'un point de vue dynamique. Dans un dernier temps, l'interaction enzyme-substrat sera modélisée par amarrage moléculaire à partir de la structure tridimensionnelle obtenue précédemment. L'approche théorique est privilégiée par rapport à une approche expérimentale (incluant la surproduction, la purification, la cristallisation et la caractérisation biophysique des protéines d'intérêt) en raison du caractère membranaire des enzymes étudiées, réputées « difficiles » à isoler dans leur conformation native et dont la perspective de résultat se révèle, souvent, aléatoire².

¹ Il est à noter que la détermination de la fonction de ces protéines a été réalisée par ailleurs dans le cadre d'un projet FNRS-FRFC (#6.8073.70) dans lequel le présent travail s'inscrit en partie.

² Voir par exemple : (1) P.J. Booth, P. Curnow, Folding scene investigation: membrane proteins, Curr. Opin. Struct. Biol. 19 (2009) 8–13 ; (2) J.U. Bowie, Solving the membrane protein folding problem, Nature 438 (2005) 581–589.

CHAPITRE 3

Chapitre 3 – Isolation et identification des séquences nucléotidique et peptidique des protéines d'intérêt

1. PREAMBULE.....	39
2. MATERIEL & METHODES.....	40
2.1. Échantillonnage	40
2.2. Préparation du matériel génétique	40
2.3. Amplification des séquences d'intérêt par PCR.....	40
2.3.1. PCR dégénérée	40
2.3.2. RACE-PCR	41
2.3.3. FL-PCR	42
2.4. Analyse bioinformatique.....	42
3. RESULTATS & DISCUSSION.....	42
3.1. Amplification des séquences d'intérêt par PCR.....	42
3.2. Identification de la nature des transcrits	43
3.3. Analyse de la séquence de <i>pfFED</i>	44
3.4. Analyse de la séquence de <i>pfELOVL</i>	47
4. REALISATIONS A L'ISSUE DE CE CHAPITRE	49
5. BIBLIOGRAPHIE	50
6. PROGRAMMES UTILISES	50

1. Préambule

Ce chapitre présente l'isolation et l'identification des séquences nucléotidique et peptidique d'une désaturase de type FED et d'une élongase de type ELOVL impliquées dans la voie de synthèse des acides gras longs polyinsaturés chez *P. fluviatilis* (voir Figure 1-9). Le matériel biologique (acides nucléiques) a été extrait du foie d'individus juvéniles avant de subir plusieurs étapes d'amplification en chaîne par polymérase (PCR)¹. Les amplicons obtenus ont ensuite été séquencés, traduits en acides aminés et finalement analysés² *in silico* sur base de séquences orthologues déposées dans les bases de données.

¹ Seuls les essais fructueux seront développés dans ce chapitre.

² Dans un souci de cohérence de l'ensemble de ce travail, une partie des analyses bioinformatiques se rapportant aux structures primaire et secondaire des protéines d'intérêt a été développée dans le *Chapitre 4 – Modélisation de la structure tridimensionnelle des protéines d'intérêt*.

2. Matériel & méthodes

2.1. Échantillonnage

Cinq juvéniles de *P. fluviatilis* ont été élevés dans les installations de l'Unité de Recherche en Biologie Environnementale & Evolutive (URBE) au sein de l'Université de Namur³. Suite à une euthanasie au MS-222 (Sigma-Aldrich, USA), le foie de chaque individu a été prélevé et directement stocké à -80°C.

2.2. Préparation du matériel génétique

Les ARN totaux (ARN_T) de chacun des foies ont été extraits à l'aide du kit InnuSPEED Tissue RNA© (Analytik Jena, Allemagne). Sur base de la concentration en acides nucléiques, mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop (Thermo Scientific, USA), 20 µg d'ARN_T ont été traités à la DNase afin d'éliminer l'ADN génomique⁴ contaminant (Ambion® DNA-free™ Kit, Life Technologies, USA). Finalement, 1 µg d'ARN_T a été rétro-transcrit en ADN complémentaire⁵ (ADNc) grâce au kit RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis (Fermentas, Allemagne).

2.3. Amplification des séquences d'intérêt par PCR

Afin d'isoler les transcrits codants pour les protéines d'intérêt, trois séries de PCR ont été réalisées successivement (dégénérée, RACE, FL), chacune précédée par une étape de conception d'amorces. Celle-ci est nécessaire car elle permet d'initier la réaction de néo-synthèse effectuée par l'ADN polymérase.

2.3.1. *PCR dégénérée*

Les séquences d'intérêt n'étant pas référencées dans les bases de données génétiques, une étape de PCR dégénérée est nécessaire afin de les isoler au sein du génome cible. Les amorces dites « dégénérées » sont un mélange de plusieurs combinaisons obtenu suite à un alignement multiple de séquences orthologues⁶ provenant de la base de données NCBI (NLM – NIH, USA) réalisé à l'aide du programme ClustalΩ (EMBL – EBI, UK) (Tableau 3-1) [1]. Les espèces ont été choisies sur base de trois critères :

- le référencement d'une séquence cible (désaturase ou élongase) dans NCBI ;
- la parenté (dans notre cas, les poissons téléostéens⁷), dans le but d'éviter les amorces trop dégénérées ;
- la diversité phylogénétique, c'est-à-dire la sélection d'espèces appartenant à des groupes différents (ici, parmi les Teleostei, les Cypriniformes, les Salmoniformes et les

³ Protocole FUNDP KE 12/169 approuvé par la Commission d'éthique en expérimentation animale de l'Université de Namur. Pour les conditions d'élevage, voir [12].

⁴ ADN présent au sein du noyau (majoritairement) et comprenant des exons (codants) et des introns (non codants).

⁵ ADN obtenu par rétro-transcription de l'ARNm et ne comprenant donc que des exons.

⁶ Séquences descendant d'une séquence unique présente dans le dernier ancêtre commun aux espèces considérées.

⁷ Les Teleostei regroupent la presque totalité des poissons osseux actuels, les exceptions notables étant les coelacanthes, les dipneustes, les polypêtres, les esturgeons et les lépisostés.

Perciformes), afin de favoriser au maximum la localisation des amorces dans les zones conservées des séquences.

La conception des amorces a été réalisée grâce aux programmes **Primer3** (Howard Hughes Medical Institute & NHGRI – NIH, USA) et **MacVector** (MacVector Inc., USA) [2].

Tableau 3-1. Numéro d'accès GenBank des séquences orthologues utilisées pour la conception d'amorces PCR dégénérées.

Ordre	Espèce	Désaturase d'acide gras	Elongase
Cypriniformes	<i>Danio rerio</i>	NP_571720	AAN77156
	<i>Cyprinus carpio</i>	AAG25711	AER39746
Salmoniformes	<i>Salmo salar</i>	AF478472	NP_001117039
	<i>Oncorhynchus mikiss</i>	AF301910	AAV67803
Perciformes	<i>Sparus aurata</i>	AAL17639	AAT81404
	<i>Dicentrarchus labrax</i>	ACD10793	CBX53576

L'amplification a été effectuée sur base d'un mélange de 50 µL contenant 1 µL d'ADNc issu de chacun des cinq foies utilisés grâce au kit Advantage® 2 Polymerase Mix (Clontech, USA). Les conditions (température, durée et nombre de cycles) de dénaturation, d'hybridation et d'élongation ont fait l'objet d'un criblage. Celui-ci est particulièrement important dans le cas de la température, puisque la fonctionnalité du couple d'amorces est presque exclusivement conditionnée par une température de fusion spécifique. L'amplicon⁸ obtenu a ensuite été déposé sur gel d'agarose 1,2 %, purifié avec le kit High Pure PCR Product Purification (Roche Applied Science, Allemagne), restreint avec les enzymes de restrictions *Nde* I (extrémité 5') et *Bam*H I (extrémité 3') (Invitrogen, USA), cloné dans le plasmide⁹ de stockage pGEM (pGEM® - T Easy Vector System I, Promega, Allemagne) et transformé en bactéries (*E. coli* NovaBlue Singles Competent Cells, Clonables™ Kit, Novagen, USA). Cette dernière étape a elle aussi fait l'objet d'un criblage (via une PCR en bactéries) afin de sélectionner les souches transformées. Après incubation, les plasmides ont été extraits à l'aide du kit GenElute™ Five-Minute Plasmid Miniprep (Sigma-Aldrich, USA) et envoyés au séquençage (Macrogen Inc., Pays-Bas).

2.3.2. RACE-PCR

L'étape précédente ne permettant d'obtenir qu'une partie de l'ADNc codant pour les protéines cibles, la RACE-PCR a comme objectif l'amplification des extrémités non traduites de la séquence d'intérêt, appelées respectivement 5'- et 3'-UTR¹⁰. Il s'agit de deux réactions d'amplification séparées, requérant l'utilisation de deux ensembles distincts d'amorces conçues à partir de la séquence identifiée lors de la PCR dégénérée. Le premier ensemble permettra d'identifier l'extrémité 5'-UTR et le second, la 3'-UTR. Les PCR de chaque amplification ont été effectuées à l'aide du kit SMARTer™ RACE cDNA Amplification (Clontech, USA). Les amplicons obtenus ont été mis sur gel d'agarose, purifiés, clonés en plasmides, transformés en bactéries et finalement envoyés au séquençage comme précédemment. De même que pour la PCR dégénérée, les amorces, les températures (de dénaturation, d'hybridation et d'élongation) ainsi que les transformations bactériennes ont fait l'objet d'un criblage.

⁸ Séquence d'ADNc obtenue par PCR.

⁹ Molécule d'ADN circulaire permettant de stocker et/ou de « transporter » une séquence spécifique, par exemple un amplicon obtenu par PCR.

¹⁰ Portion d'ARNm encadrant la séquence traduite en protéine. La région 5'-UTR se situe en amont du codon START et la région 3'-UTR en aval du codon STOP.

2.3.3. FL-PCR

La FL-PCR est l'ultime étape d'amplification, permettant d'obtenir l'entièreté de l'ORF¹¹ cible. Les amorces FL ont été conçues dans les régions UTR précédemment séquencées. La méthodologie employée est identique à celle de la PCR dégénérée.

2.4. Analyse bioinformatique

Les transcrits isolés grâce aux différentes séries de PCR ont été analysés *in silico*. Leur identification a été réalisée avec le protocole BLAST de la base de données NCBI. Les séquences en nucléotides ont ensuite été traduites en acides aminés via le programme **ExPASy Translate tool** (Swiss Institute of Bioinformatics, Suisse) et alignées avec leurs orthologues chez d'autres espèces de poissons avec le programme **MAFFT** (CBRC – AIST, Japon) [3,4]. Enfin, des arbres phylogénétiques¹² ont été construits grâce au programme **MEGA5** (Arizona State University, USA) [5].

3. Résultats & discussion

3.1. Amplification des séquences d'intérêt par PCR

Comme déjà précisé précédemment, les amorces PCR et les conditions d'amplification ont fait l'objet d'un criblage. Concernant les amorces, plusieurs couples ont été conçus pour les différentes étapes de PCR et seuls ceux présentant l'amplification la plus importante ont été sélectionnés (Figure 3-1 à titre d'exemple ; Tableau 3-2). Les conditions de réalisation des différentes PCR ont elles aussi fait l'objet d'une optimisation à partir des recommandations incluses dans le manuel d'utilisation des différents kits utilisés (Tableau 3-3). Enfin, la sélection des colonies bactériennes utilisées ici s'est basée sur le critère de présence/absence de l'amplicon attendu (Figure 3-1 à titre d'exemple).

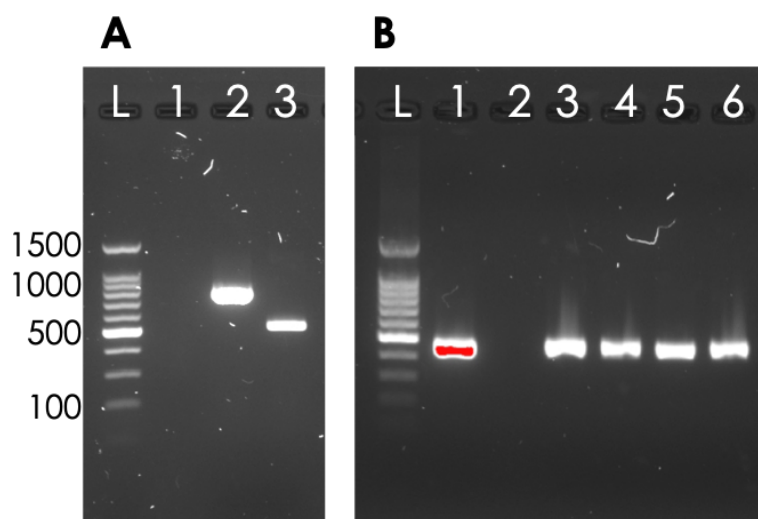


Figure 3-1. **A** – Exemple de criblage d'amorces par PCR dégénérée dans le cas de l'amplification de la *pfFED*. Puits L, marqueur moléculaire 100 bp ; puits 1 à 3, couples d'amorces 1 à 3. On remarque que le couple 1 n'est pas fonctionnel. Les couples 2 et 3 fournissent tous deux une bande, respectivement à 800 et 500 bp (la taille de l'amplicon est fonction du site d'hybridation des amorces à la séquence-cible). **B** – Exemple de criblage de colonies

bactériennes par PCR dans le cas de l'amplification de *pfELOVL*. Puits L, marqueur moléculaire 100 bp ; puits 1 à 6, colonies 1 à 6. On remarque que la colonie 2 ne donne aucune bande, contrairement aux 5 autres, à 500 bp (taille attendue de l'amplicon).

¹¹ Cadre ouvert de lecture, c'est-à-dire portion d'ADN susceptible d'être traduite en protéine.

¹² Arbres schématisés illustrant les relations de parentés entre les espèces considérées.

Tableau 3-2. Amorces des PCR dégénérées, RACE et FL. T_m, température de fusion.

PCR	Amorces	Séquence des amorces	T _m (°C)
pfFED			
Deg.	Fads-deg-F1	5'-ACVGAGCCSAGCCAGGACC-3'	66,0
	Fads-deg-R1	5'-KTGATTCATCTGWTACCCCA-3'	47,3
5'-RACE	Fads-5'-R1	5'-GCCTCCAGCAGAAGGATGTG-3'	64,0
	Fads-5'-R2	5'-AGAAGAACAAAGGCCGAGCTCGA-3'	52,0
	Fads-5'-R3	5'-ATGGTTGCATTTTGTTCGGTCC-3'	48,9
3'-RACE	Fads-3'-F1	5'-CACCATGATTCCCGCCGTGA-3'	51,2
	Fads-3'-F2	5'-TGCGCTACCTGTGCTGTTCTATA-3'	50,2
	Fads-3'-F3	5'-GGTTGTGTGGGTGACTCAGATG-3'	52
FL	Fads2-dig-F	5'-CCCAAGCTTATGGGAGGTGGAGGCCAGCT-3'	62,1
	Fads2-dig-R	5'-GCGGGATCCTCATTTATGCAGATATGCATC-3'	56,5
pfELOVL			
Deg.	Elovl-deg-F1	5'-YVCTDTGGTGGTAYTAYTTCTC-3'	46,0
	Elovl-deg-R1	5'-TRTANGTCTKWATGTAGAAGTT-3'	42,3
5'-RACE	Elo-5'-R1	5'-TAGAAGGACAAGACTGTGAGGCCCAGATTGT-3'	58,0
	Elo-5'-R2	5'-TACGGCTGCCTGTGTTTCATGTACTTG-3'	54,6
	Elo-5'-R3	5'-TAGTTGTCGAGCAGCAGCCATCCCTG-3'	57,6
3'-RACE	Elo-3'-F1	5'-CAGCTTCGTCCACGTTGTGATGTATTC-3'	54,6
	Elo-3'-F2	5'-GAAGAAGTACATCACACAGTTACAGCTGA-3'	53,6
	Elo-3'-F3	5'-AAGGGATGGCTGTACTCCCAAACAAG-3'	54,4
FL	Elvol5-dig-F	5'-CCCAAGCTTATGGAGACCTTAATCATAA-3'	52,2
	Elovl5-dig-R	5'-GCGGGATCCTCAATCCACCCTCAGTTTCT-3'	59,3

Tableau 3-3. Conditions de réalisation des PCR dégénérées, RACE et FL pour pfFED et pfELOVL.

	PCR dégénérée	RACE-PCR1	RACE-PCR2/3	FL-PCR
Dénaturation initiale	10 min. à 95°C	5 min. à 94°C	5 min. à 95°C	2 min. à 94°C
Cycles	37	35	35	37
Dénaturation	1 min. à 95°C	0,5 min. à 94°C	0,5 min. à 95°C	0,75 min. à 95°C
Hybridation	1 min. à 52°C	0,30 min. à 68°C	0,5 min. à 52°C	0,75 min. à 55°C
Elongation	2 min. à 72°C	3 min. à 72°C	1 min. à 68°C	2 min. à 68°C
Elongation finale	10 min. à 72°C	5 min. à 72°C	5 min. à 68°C	5 min. à 68°C

3.2. Identification de la nature des transcrits

Les différentes séries de PCR ont permis d'amplifier deux transcrits, dont les ORF font 1338 et 885 paires de bases, codant deux protéines de respectivement 445 et 294 acides aminés (Figures 3-2 & 3-3). Après confrontation avec la base de données NCBI, il s'avère que la première correspond à une désaturase de type « front-end » (pfFED – GenBank : AIY25022) et la seconde à une élongase de type ELOVL (pfELOVL – GenBank : KR360724).

A atgggaggtggaggccagctaacggagccagaagagccgatcagcgggagctgctggtgtctacacctg
ggaggaggtgcaaagccactgcaaccggaatgaccagtggctggtgatagatcgaaaggtttacaacatca
cacagtgggccaagacacccaggaggattcgagtcacagccactatgctggagaggatgccacggag
gcattcactgctttcatccagatttaaagtttggtgcaaaagtttctgaagccgctgcagattggagagct
ggcagcgacagagcccagccaggaccgaacaaaaatgcaaccatcatacaggatttccatactttacgtg
ctcaggtggagagcgagggtctgtttcagctcggcctttgttcttctgcctccacctgggtcacatcctt
ctgctggaggccctcgctggctgatcatctgggtctggggaactagctggactctgacctttctgagcgc
cgtcatattagcaaccactcagttgcaggctggatggctgcagcatgactttggccacctgtctgtcttca
agaagtccagctggaatcacttgttgcacaagtttgcattgggtcatttgaaggagcgctctgccaactgg
tggaatcacccggcatttccagcatcacgctaaccacaacatcttcagtaaggacctgatgtcaacatgtt
gcacgtctttgtagttggagaaactcaaccagtggagtatggcataaaaaagatcaaatatatgccttctc
accaccaacacaagtaacttcttctcgttggccaccgcttctcattccagtttacttccacattcaata
atacacaccatgatttcccgccgagctgggtggatctggcttgggtctttgtcttactacctgcgtacct
gtgctgttctatacccatgtttggcctgtttggctcagtggtgtttatcagcttcatcaggtttttggaga
gtcacgggtttgtgtgggtgactcagatgagtcacgtgcccattggacatcgaccacgagaagaaccaggac
tggctgtccatgcagttacaagccacctgtaacataaagcagtccttctcaacgactggttcagcggaca
cctcaactttcaaatcgaacaccatttgtttccaacaatgccgcgccacaactaccacctggtggcccg
tggctcgtgcactgtgtgagaaacatgggggttcttaccaggtgaaaacattgtggcagggtctcgctgat
gttttcagggtcactgaaacactcaggcgacctctggcttgatgcataatctgcataaatga

B MGGGGQLTEPEEPISGRAAGVYTWEVQSHCNRNDQWLVIDRKVYNITQWAKRHPGGIRVISHYAGEDATE
AFTAFHPDLKFVQKFLKPLQIGELAATEPSQDRNKNATIIQDFHTLRAQVESEGLFRARPLFFCLHLGHIL
LLEALAWLIIWWGTSWTLTFLSAVILATTQLQAGWLQHDGHLVFKKSSWNHLLHKFVIGHLKGASANW
WNHRHFQHHAKPNIFSKDPDVNMLHVFVVGGETQPVEYGIKKIKYMPYHHQHKYFFLVGPPLIPVYFHIQI
IHTMISRRDWDLAWSLSYYLRYLCCSIPMFGFLGSSVVFISFIRFLESHGFVWVTQMSHLPMDIDHEKNQD
WLSMQLQATCNIKQSLFNDWFSGHLNFQIEHHLFPTMPRHNYHLVAPLVRLCEKHGVPYQVKTLWQGFAD
VFRSLKHSGDLWLDAYLHK

Figure 3-2. A – Séquence nucléotidique de *pfFED*. **B** – Séquence peptidique de *pfFED*.

A atggagacctttaatcataaactgaacacttactttgagacatggatgggtcccagagatcagcgggtgca
gggatggctgctgctcgacaactaccaccaacctttgcactcacagtaatgtaccttctgatcggtgga
tggggccaagtacatgaaacacaggcagcgtactcctgcagaggcctcctgggtgctctacaatctgggc
ctcacagtcttgccttctacatgttctatgagcttgttactgctgtgtggtacgggtggctacaacttcta
ctgccaggacactcacagtgcagggaagcagataataagatcataaatgccctgtgggtggtactacttct
ccaagctcattgagttcatggacaccttttcttatactacggaagaataatcaccagatgacgtttctt
cacatctaccaccatgctaccatgctgaatatctgggtggtttgttgtgaactgggtaccctgcgccatac
atacttcggcccccactataaacagcttcgtccacgttgtgatgtattcttactacggtctgtcagccatcc
cagccatgcggccatactgtggtggaagaagtacatcacacagttacagctgatccagttcttttaacc
atctaccagacgatgtgtgcagccatattggccatgtggctttcccaagggtggctgtactccaaacaag
ttacatgggtcacactcattttatttttcttaacttctacattcagacttacaagaagcacagtgggtctc
tcaagaaggagcatcacaacggctctcctgtatcaacaaatggaaatgcaaatgcgacaccatctctggag
cgtactgcacacaagaaactgagggtggattga

B MGGGGQLTEPEEPISGRAAGVYTWEVQSHCNRNDQWLVIDRKVYNITQWAKRHPGGIRVISHYAGEDATE
AFTAFHPDLKFVQKFLKPLQIGELAATEPSQDRNKNATIIQDFHTLRAQVESEGLFRARPLFFCLHLGHIL
LLEALAWLIIWWGTSWTLTFLSAVILATTQLQAGWLQHDGHLVFKKSSWNHLLHKFVIGHLKGASANW
WNHRHFQHHAKPNIFSKDPDVNMLHVFVVGGETQPVEYGIKKIKYMPYHHQHKYFFLVGPPLIPVYFHIQI
IHTMISRRDWDLAWSLSYYLRYLCCSIPMFGFLGSSVVFISFIRFLESHGFVWVTQMSHLPMDIDHEKNQD
WLSMQLQATCNIKQSLFNDWFSGHLNFQIEHHLFPTMPRHNYHLVAPLVRLCEKHGVPYQVKTLWQGFAD
VFRSLKHSGDLWLDAYLHK

Figure 3-3. A – Séquence nucléotidique de *pfELOVL*. **B** – Séquence peptidique de *pfELOVL*.

3.3. Analyse de la séquence de *pfFED*

L'analyse phylogénétique montre que la désaturase de *P. fluviatilis* se regroupe avec les FED d'autres Perciformes (*Epinephelus coioides*, *Siniperca chuatsi*, *Dicentrarchus labrax*) et de manière plus générale, d'espèces marines (*Sparus aurata*, *Scophthalmus maximus*, *Rachycentron canadum*, *L. calcarifer*, *Thunnus maccoyii*, *Gadus morhua*) (Figure 3-4). Par ailleurs, *pfFED* apparaît

dans le groupe des désaturases des Teleostei, qui se distingue d'une part de celui des $\Delta 6D$ des autres vertébrés, et de celui des $\Delta 5D$ d'autre part. L'alignement de notre séquence¹³ avec des orthologues d'autres espèces révèle une identité respective de 91 %, 88 %, 87 %, 79 %, 78 % et 69 % avec la $\Delta 6D$ d'*E. coioides*, *S. aurata*, *S. chuatsi*, *O. niloticus*, *S. salar* et *D. rerio*, ainsi que de 78 % et 77 % avec respectivement la $\Delta 5D$ d'*O. mykiss* et *S. salar*.

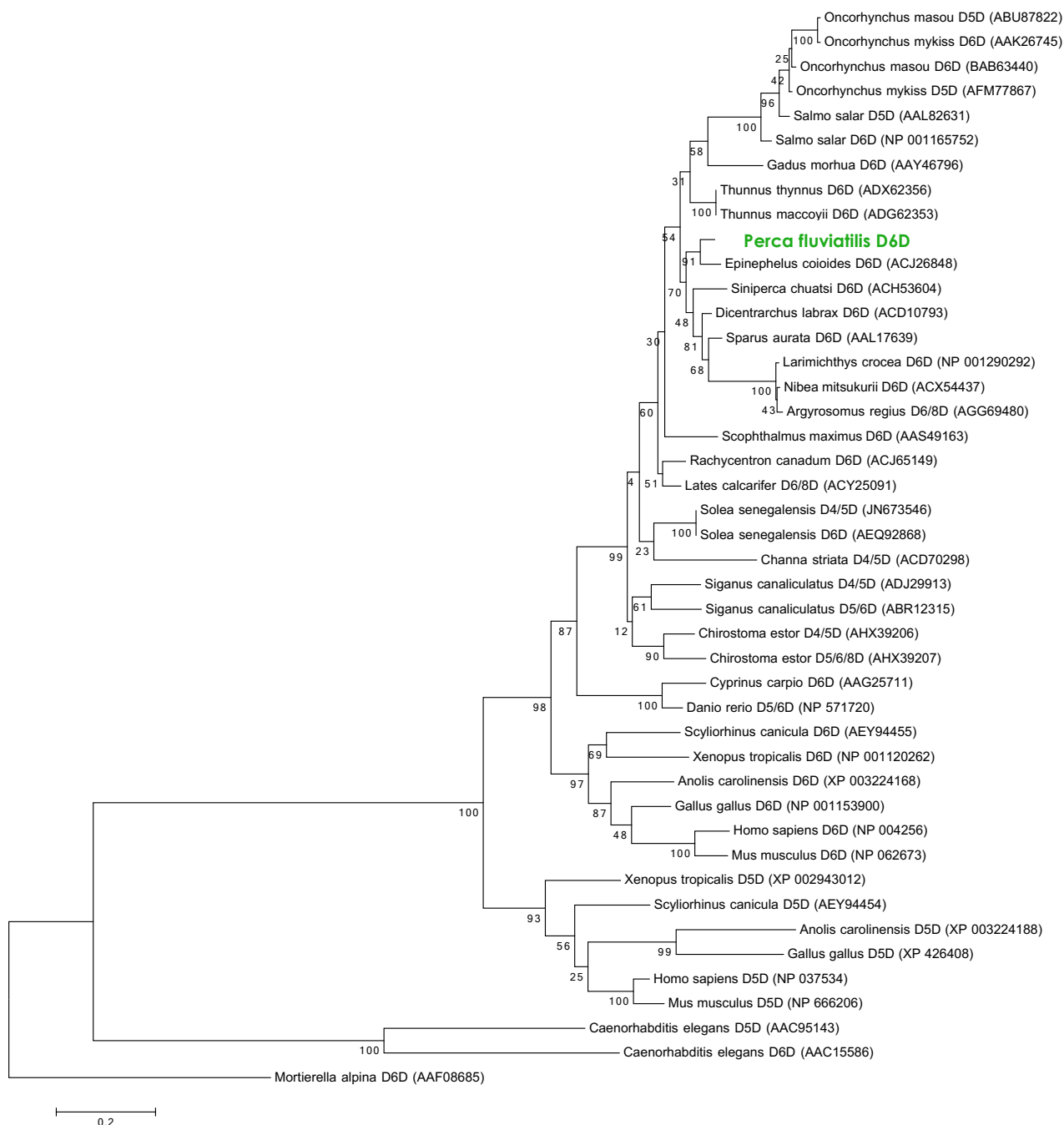


Figure 3-4. Arbre phylogénétique des désaturases $\Delta 5D$ et $\Delta 6D$ chez les vertébrés (poissons, amphibiens, reptiles, oiseaux et mammifères). *Mortierella alpina* constitue « l'out-group » permettant d'enraciner l'arbre.

¹³ Via le protocole « BLAST » de NCBI.

La nature de notre désaturase ne peut néanmoins être déterminée sur les seules bases de l'alignement ou de l'analyse phylogénétique. En effet, les désaturases « *front-end* » dérivent d'un même ancêtre commun, appelé *fads*, qui s'est dupliqué en même temps que la totalité du génome (WGD) lors de l'émergence des vertébrés, conduisant à la formation des *fads1* et *fads2* ancestraux. Par la suite, les deux gènes ont évolué indépendamment l'un de l'autre. Tandis que *fads1* s'est maintenu dans les lignées de poissons « anciens »¹⁴ et chez les autres vertébrés¹⁵, subissant même plusieurs événements de duplication chez les reptiles et les oiseaux, il a totalement disparu chez les poissons téléostéens. En revanche chez ceux-ci, *fads2* a subi plusieurs phases indépendantes de duplication et de diversification fonctionnelle. Ainsi, les activités $\Delta 4$, $\Delta 5$, $\Delta 6$ et $\Delta 8$ de leurs désaturases lipidiques sont entièrement prises en charge par *fads2* [6–9]. Ce qui explique la plus grande proximité trouvée entre notre désaturase et la $\Delta 5D$ d'*O. mykiss* (84 % d'homologie) plutôt qu'avec la $\Delta 6D$ de *Scyliorhinus canicula* (68 % – poisson cartilagineux) ou de *Mus musculus* (66 % – mammifère). Une étude fonctionnelle¹⁶ a donc permis de mettre en évidence l'activité $\Delta 6$ de notre désaturase pour les C18 des séries $\omega 6$ (LA) et $\omega 3$ (ALA) – mais pas pour le C24:5n-3, précurseur du DHA (Figure 1-9) [10].

D'un point de vue structurel, l'alignement de séquence avec les désaturases (monofonctionnelles $\Delta 5D$ et $\Delta 6D$ et bifonctionnelles $\Delta 5\Delta 6D$) d'autres espèces de poissons dulcicoles (*O. niloticus*, *O. mykiss* et *D. rerio*), marins (*S. aurata* et *R. canadum*) et anadromes (*S. salar*) confirme la présence des différents motifs conservés par les désaturases de type FED¹⁷ : un domaine cytochrome b_5 N-terminal (D³⁵...H⁷⁷), 4 hélices α transmembranaires (C¹³⁶...W¹⁵⁶, T¹⁵⁸...G¹⁷⁸, Q²⁶³...Q²⁸³, F³⁰⁰...L³³⁰) et les 3 « boîtes His » (H¹⁸¹DFGH¹⁸⁵, H²¹⁸FQHH²²², Q³⁸³IEHH³⁸⁷) (Figure 3-5).

3.4. Analyse de la séquence de pfELOVL

L'analyse phylogénétique, comparant les élongases de différentes espèces de poissons, montre que la séquence de *P. fluviatilis* se regroupe avec les ELOVL d'autres Perciformes (*S. aurata* et *E. coioides*) au sein d'espèces marines (*Nibea mitsukurii*, *Argyrosomus regius*, *D. labrax*, *S. canaliculatus*, *S. maximus*, ...) (Figure 3-6). De manière générale, pfELOVL apparaît dans le sous-groupe ELOVL5 du groupe ELOVL2/5, distinct de ceux des ELOVL4 et ELOVL1/6/7. L'alignement de la séquence¹⁸ de *P. fluviatilis* avec des orthologues d'autres espèces révèle une identité respective de 90 %, 89 %, 78 % et 73 % avec l'ELOVL5 de *L. calcarifer*, *E. coioides*, *S. salar* et *D. rerio* ainsi que 77 % avec l'ELOVL2 d'*O. mykiss*. Etant donné l'évolution indépendante des différentes sous-familles d'élongases de type ELOVL au sein des lignées biologiques (contrairement aux désaturases), et comme pfELOVL se place au sein du sous-

¹⁴ Poissons sans mâchoire et cartilagineux.

¹⁵ Amphibiens, reptiles, oiseaux et mammifères.

¹⁶ pfFED, exprimée en système hétérologue (*Saccharomyces cerevisiae*), a été testée pour les substrats des activités $\Delta 5$ (C20:3n-6 et C20:4n-3), $\Delta 6$ (C18:2n-4 et C18:3n-3) et $\Delta 8$ (C20:3n-3). Dans un premier temps, les levures transformées par transfection ont poussé sur du milieu enrichi en substrats. Dans un deuxième temps, les lipides cellulaires totaux ont été extraits, analysés par chromatographie et comparés à des profils standards, révélant ainsi les produits synthétisés *de novo* [10].

¹⁷ Informations concordantes avec la littérature mais jamais expérimentalement démontrées – voir Chapitre 4 pour plus de détails.

¹⁸ Via le protocole « BLAST » de NCBI.

groupe ELOVL5, il est hautement probable qu'elle appartienne également à ce dernier [7,8,11]. Cependant, une étude fonctionnelle¹⁹ serait nécessaire pour confirmer cette hypothèse.

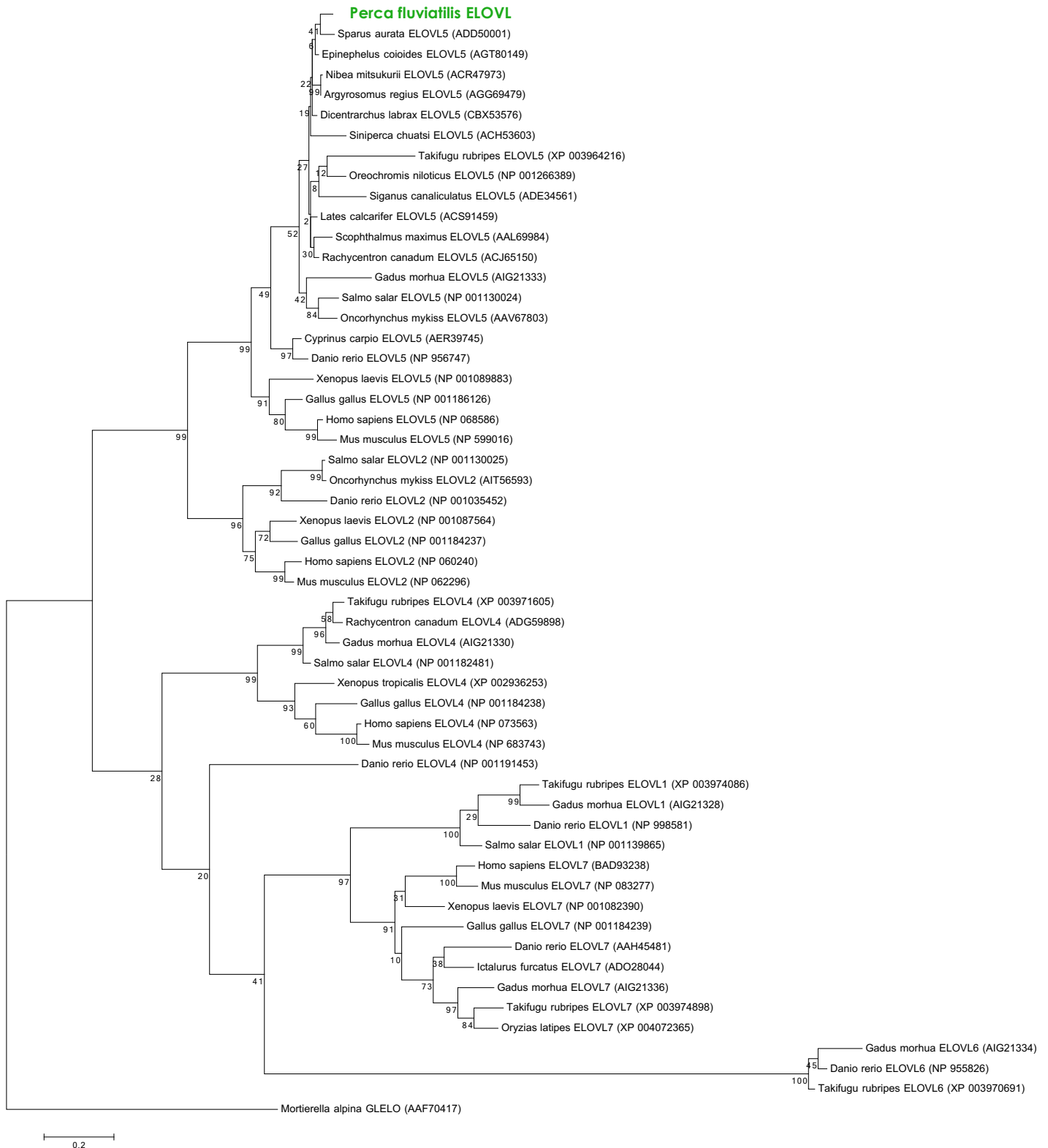


Figure 3-6. Arbre phylogénétique des élongases ELOVL chez les vertébrés (poissons, amphibiens, reptiles, oiseaux et mammifères). *Mortierella alpina* constitue « l'out-group » permettant d'enraciner l'arbre.

¹⁹ Une telle étude a été réalisée dans le cadre du projet FNRS-FRFC #6.8073.70 mais n'a pas fourni de résultats concluants.

D'un point de vue structurel, l'alignement de séquences avec les élongases (des groupes ELOVL2/5 et ELOVL4) d'autres espèces de poissons dulcicoles (*O. niloticus*, *O. mykiss* et *D. rerio*), marins (*S. aurata* et *R. canadum*) et anadromes (*S. salar*) montre que *pfELOVL* inclut toutes les caractéristiques des élongases de ce type²⁰ : plusieurs hélices α transmembranaires (N³¹...K⁵¹, L⁶⁵...T⁸⁵, I¹⁰⁹...F¹²⁹, F¹⁴¹...V¹⁶¹, G¹⁶⁹...I¹⁸⁹, Y²⁰¹...A²²¹, K²²⁹...F²⁴⁹), un signal de rétention au RE (K²⁸⁸KLR²⁹²) et les 4 « boîtes conservées » (boîte KEDT, K¹²⁰LIEFMDT¹²⁷; boîte His, Q¹³⁸MTFLHIYHH¹⁴⁷; boîte Tyr, N¹⁷³SFVHVVMYSY¹⁸⁴; et boîte Gln, T²⁰³QLQLIQ²⁰⁹) (Figure 3-7).

P. fluviatilis ELOVL	---METFNHKLNT---YFETWMGPRDQVRVQGWLLLDNYPPTFALTVMYLLIVVMGPKYMKHR
S. aurata ELOVL5 (ADD50001)	---METFNHKLNV---YFETWMGPRDQVRVQGWLLLDNYPPTFALTVMYLLIVVMGPKYMKHR
O. niloticus ELOVL5 (NP_001266389)	---METFNHKLNA---YIDSWMGPRDQVRVQGWLLLDNYPPTFALTVMYLLIVVMGPKYMKHR
S. salar ELOVL5 (NP_001130024)	---MEAFNHKLNT---YIDSWMGPRDQVRVQGWLLLDNYPPTFALTVMYLLIVVMGPKYMKHR
O. mykiss ELOVL2 (AIT56593)	MNHLQSLDERLNA---LFYFLFEDRDSRVQGWLLMDSYLPTLSLTILYLLTVYLGSKYMRNR
D. rerio ELOVL2/5 (NP_956747)	---METFSHRVNS---YIDSWMGPRDLRVTVGWFLLDYIPTFIFTVMYLLIVVMGPKYMKNR
R. canadum ELOVL4 (ADG59898)	---MEVVTTFVNDTVEFYKWSLTADKRVENWPMMA SPLPLTALSCLYLLFLWVGPRYMQDR
	:: . . : * : * * . : . * : : : * : : * : *
P. fluviatilis ELOVL	QPYSCRGLLVLYNLGLTVLSFYMFYELVTAVWYGGYNFYCQDTHSAKE-ADNKIINALWYVY
S. aurata ELOVL5 (ADD50001)	QPYPCRGLLVLYNLGLTVLSFYMFYELVTAVWYGGYNFYCQDTHSAKE-VDNKIINVLWYVY
O. niloticus ELOVL5 (NP_001266389)	QPYSCRAVMVLYNLGLTVLSFYMFYELVSAWVGGYNFYCQDTHSAEE-ADIKVINVLWYVY
S. salar ELOVL5 (NP_001130024)	QPVSCQGLVLYNLGLTVLSFYMFYELVSAWVGGYNFYCQDTHSAGE-TDTKIINVLWYVY
O. mykiss ELOVL2 (AIT56593)	PAYSLKGVLOVYNFSVTMLSLYMLVLSVATLSAGYRLQCQGLHEAGE-ADLRVAKVLWYVY
D. rerio ELOVL2/5 (NP_956747)	QAYSCRALVLYNLGLTVLSFYMFYELVMSVYQGGYNFYCQDTHSGGD-ADNRMMNLWYVY
R. canadum ELOVL4 (ADG59898)	QPYTLRRTLVYNFSMVLNFIYAKELLIATRAAGYSYLCQPVNYSNDVNEVRIASALWYVY
	: : * : : : * : : : : . * * : : : : : : : : *
P. fluviatilis ELOVL	FSKLIIEFMDTFFILRKNNHQITFLHYHHATMLNIWVFMVNWPCGHTYFGPTINSEFVHV
S. aurata ELOVL5 (ADD50001)	FSKLIIEFMDTFFILRKNNHQITFLHYHHATMLNIWVFMVNWPCGHSYFGASLNSFVHV
O. niloticus ELOVL5 (NP_001266389)	FSKLIIEFMDTFFILRKNNHQITFLHYHHATMLNIWVFMVNWPCGHSYFGASLNSFVHV
S. salar ELOVL5 (NP_001130024)	FSKLIIEFMDTFFILRKNNHQITFLHYHHATMLNIWVFMVNWPCGHSYFGASLNSFVHV
O. mykiss ELOVL2 (AIT56593)	FSKLIIEFMDTFFILRKNNHQITFLHYHHATMLNIWVFMVNWPCGHSYFGASLNSFVHV
D. rerio ELOVL2/5 (NP_956747)	FSKLIIEFMDTFFILRKNNHQITFLHYHHATMLNIWVFMVNWPCGHSYFGASLNSFVHV
R. canadum ELOVL4 (ADG59898)	ISKGVFEFLDTVFFILRKNNHQITFLHYHHATMLNIWVFMVNWPCGHSYFGASLNSFVHV
	: * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
P. fluviatilis ELOVL	MYSYGLSAT-PAMRPYLWKKYITQQLIQFFLTITQTMCAIWPCCGFPKGWLYSQTSMYV
S. aurata ELOVL5 (ADD50001)	MYSYGLSAT-PAMRPYLWKKYITQQLIQFFLTITQTMCAIWPCCGFPKGWLYSQTSMYV
O. niloticus ELOVL5 (NP_001266389)	MYSYGLSAT-PAIRPYLWKKYITQQLIQFFLTITQTMCAIWPCCGFPKGWLYSQTSMYV
S. salar ELOVL5 (NP_001130024)	MYSYGLSAT-PAIRPYLWKKYITQQLIQFFLTITQTMCAIWPCCGFPKGWLYSQTSMYV
O. mykiss ELOVL2 (AIT56593)	MYSYGLSTI-PSMQYLLWKKYITQQLIQFFLTITQTMCAIWPCCGFPKGWLYSQTSMYV
D. rerio ELOVL2/5 (NP_956747)	MYSYGLSAV-PALRPYLWKKYITQQLIQFFLTITQTMCAIWPCCGFPKGWLYSQTSMYV
R. canadum ELOVL4 (ADG59898)	MYSYGLAALGPQMQLWKKYITQQLIQFFLTITQTMCAIWPCCGFPKGWLYSQTSMYV
	** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *
P. fluviatilis ELOVL	TLILFLNFYIQTYYKHS---LKKEHHNGSPVSTNGNANATPSLERTAH-KKLRVD--
S. aurata ELOVL5 (ADD50001)	TLILFLNFYIQTYYKHS---LRKEHNGSPVSTNGNANGTPSMEHTAH-KKLRVD--
O. niloticus ELOVL5 (NP_001266389)	TLILFLNFYIQTYYK---SGS---QRKHPQNSLLSTNGHANGTPSTDTAP-KKLRVD--
S. salar ELOVL5 (NP_001130024)	SLIAFFNFYIQTYYKHS---QKEYHQNGSVDSLNGHANGVPTETITH-RKVRVD--
O. mykiss ELOVL2 (AIT56593)	TLVILEVNFYVQTYRKRPEES-IKSSRPNGHTVSTNGTSF-----KK-RK---
D. rerio ELOVL2/5 (NP_956747)	TLILFLNFYIQTYYKHS---RKSDYPNGS---VNGHTNGVMSSEKIKH-RKARAD--
R. canadum ELOVL4 (ADG59898)	TEILFLNFYIQTYYKHS---RKSDYPNGS---VNGHTNGVMSSEKIKH-RKARAD--
	:: : * * * : : . . . * : * : : : * : *

Figure 3-7. Alignement de l'élongase de *P. fluviatilis* avec des séquences orthologues de poissons. Les numéros d'accessibilité GenBank sont indiqués entre parenthèses. En gris, le motif de rétention au réticulum endoplasmique ; en bleu souligné, les hélices α transmembranaires ; en rouge, les boîtes conservées. Légende de l'alignement : (*), identité de séquence ; (:), substitution conservative ; (.), substitution semi-conservative ; (_), substitution non conservative.

4. Réalisations à l'issue de ce chapitre

Par cette approche génétique, nous avons réussi, grâce à l'amplification par PCR, à isoler et identifier deux enzymes du métabolisme des acides gras longs chez *P. fluviatilis* : une $\Delta 6$ désaturase (*pf* $\Delta 6D$) et une élongase ELOVL5 (*pf*ELOVL5).

²⁰ Informations concordantes avec la littérature mais jamais expérimentalement démontrées – voir Chapitre 4 pour plus de détails.

5. Bibliographie

- [1] F. Sievers, A. Wilm, D. Dineen, T.J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Remmert, J. Söding, J.D. Thompson, D.G. Higgins, Fast , scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega, *Mol. Syst. Biol.* 7 (2011) 1–6.
- [2] A. Untergasser, I. Cutcutache, T. Koressaar, J. Ye, B.C. Faircloth, M. Remm, S.G. Rozen, Primer3 – new capabilities and interfaces, *Nucleic Acids Res.* 40 (2012) e115.
- [3] K. Katoh, J. Rozewicki, K.D. Yamada, MAFFT online service: multiple sequence alignment , interactive sequence choice and visualization, *Brief. Bioinform.* (2017) 1–7.
- [4] E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M.R. Wilkins, R.D. Appel, A. Bairoch, Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server, in: J.M. Walker (Ed.), *Proteomics Protoc. Handb.*, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2005: pp. 571–607.
- [5] K. Tamura, D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, S. Kumar, MEGA5 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods, *Mol. Biol. Evol.* 28 (2011) 2731–2739.
- [6] L.F.C. Castro, Ó. Monroig, M.J. Leaver, J. Wilson, I. Cunha, D.R. Tocher, Functional Desaturase Fads1 ($\Delta 5$) and Fads2 ($\Delta 6$) Orthologues Evolved before the Origin of Jawed Vertebrates, *PLoS One* 7 (2012) e31950.
- [7] L.F.C. Castro, D.R. Tocher, O. Monroig, Long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in chordates: Insights into the evolution of Fads and Elovl gene repertoire, *Prog. Lipid Res.* 62 (2016) 25–40.
- [8] K. Hashimoto, A.C. Yoshizawa, S. Okuda, K. Kuma, S. Goto, M. Kanehisa, The repertoire of desaturases and elongases reveals fatty acid variations in 56 eukaryotic genomes, *J. Lipid Res.* 49 (2008) 183–191.
- [9] K. Hashimoto, A.C. Yoshizawa, K. Saito, T. Yamada, M. Kanehisa, The repertoire of desaturases for unsaturated fatty acid synthesis in 397 genomes, *Genome Informatics* 17 (2006) 173–183.
- [10] F. Geay, E. Tinti, J. Mellery, C. Michaux, Y. Larondelle, E. Perpète, P. Kestemont, Cloning and functional characterization of $\Delta 6$ fatty acid desaturase (FADS2) in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*), *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 191 (2016) 112–125.
- [11] X. Xue, C.Y. Feng, S.M. Hixson, K. Johnstone, D.M. Anderson, C.C. Parrish, M.L. Rise, Characterization of the fatty acyl elongase (elovl) gene family, and hepatic elovl and delta-6 fatty acyl desaturase transcript expression and fatty acid responses to diets containing camelina oil in Atlantic cod (*Gadus morhua*), *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 175 (2014) 9–22.
- [12] F. Geay, D. Wenon, J. Mellery, E. Tinti, S.N.M. Mandiki, D.R. Tocher, C. Debier, Y. Larondelle, P. Kestemont, Dietary Linseed Oil Reduces Growth while Differentially Impacting LC-PUFA Synthesis and Accretion into Tissues in Eurasian Perch (*Perca fluviatilis*), *Lipids* 50 (2015) 1219–1232.

6. Programmes utilisés

- Base de données de séquences : NCBI – NLM-NIH, USA (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- Alignements de séquences nucléotidiques : Clustal Ω – EMBL-EBI, UK (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)
- Conception d'amorces
 - Primer3 – Howard Hughes Medical Institute & NHGRI-NIH, USA (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>)
 - MacVector Inc. (<http://macvector.com/>)
- Traduction : ExPASy Translate tool – Swiss Institute of Bioinformatics, Suisse (<http://web.expasy.org/translate/>)
- Alignements de séquences peptidiques : MAFFT – CBRC-AIST, Japon (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/>)
- Construction d'arbres phylogénétiques : MEGA5 – Arizona State University, USA (<http://www.megasoftware.net/>)

CHAPITRE 4

Chapitre 4 – Modélisation de la structure tridimensionnelle des protéines d'intérêt

1. PREAMBULE.....	51
2. MATERIEL & METHODES.....	52
2.1. Organisation 1D	52
2.2. Organisation 2D	52
2.2.1. Structure secondaire	52
2.2.2. Solubilité, localisation et adressage	53
2.2.3. Insertion et organisation en membrane	53
2.3. Organisation 3D	54
2.3.1. Généralités.....	54
2.3.2. Méthodologie appliquée	54
2.3.3. Paramètres utilisés	55
2.4. Interactions enzyme-substrat.....	56
3. RESULTATS & DISCUSSION.....	56
3.1. Modélisation de <i>pf</i> Δ6D	56
3.1.1. Organisation 1D	56
3.1.2. Organisation 2D	57
3.1.3. Organisation 3D	59
3.2. Modélisation de <i>pf</i> ELOVL5.....	65
3.2.1. Organisation 1D	65
3.2.2. Organisation 2D	65
3.2.3. Organisation 3D	67
3.2.4. Interactions enzyme-substrat.....	72
4. REALISATIONS A L'ISSUE DE CE CHAPITRE	74
5. BIBLIOGRAPHIE	74
6. PROGRAMMES UTILISES	79

1. Préambule

Ce chapitre présente les travaux *in silico* réalisés sur base des séquences obtenues expérimentalement pour la désaturase *pf*Δ6D et l'élongase *pf*ELOVL5. Les modèles obtenus concernent les organisations 2D¹ (dont la structure secondaire) et/ou 3D² (structure tertiaire) des protéines d'intérêt, ainsi que des hypothèses concernant les propositions d'interactions enzyme-substrat par amarrage moléculaire³.

¹ Pour *pf*Δ6D et *pf*ELOVL5.

² Pour *pf*ELOVL5 seulement (voir point 3.1.3. pour les explications).

³ Pour *pf*ELOVL5 seulement (voir point 3.1.3. pour les explications).

2. Matériel & méthodes

L'ensemble des prédictions se rapportant à la structure de *pfΔ6D* et de *pfELOVL5* a été réalisé moyennant l'utilisation de programmes informatiques accessibles en ligne. Ceux-ci ont été l'objet d'un développement au sein d'universités et d'instituts de recherche et ont donné lieu à des publications scientifiques dans des revues à comité de lecture. Les liens d'accès des programmes et des références y afférentes sont répertoriés dans la section bibliographique.

2.1. Organisation 1D

L'organisation « 1D » se rapporte à la structure primaire, c'est-à-dire la séquence en acides aminés des protéines d'intérêt. Celle-ci a été traduite à partir des données obtenues dans le cadre de l'analyse génétique (voir Figures 3-2 & 3-3).

Deux informations supplémentaires y ont été associées : la masse moléculaire et le point isoélectrique. La masse moléculaire (MW) correspond à la somme des masses de chacun des atomes constituant la molécule. Le point isoélectrique (pI) est le pH pour lequel la charge globale d'une molécule est nulle. Ces deux données ont été calculées via les programmes suivants : **EMBOSS Pepstats tool** (European Bioinformatics Institute – European Molecular Biology Laboratory, Royaume-Uni), **ExPASy Compute pI/MW tool** (Swiss Institute of Bioinformatics, Suisse), **ExPASy ProtParam**, **Peptide Property Calculator** (Center for Biotechnology, Northwestern University, USA), et **Scansite 3** (Koch Institute for Integrative Cancer Research, Massachusetts Institute of Technology, USA) [1-3].

2.2. Organisation 2D

Différents éléments ont été regroupés sous l'appellation d'organisation « 2D » : d'une part la structure secondaire proprement dite – c'est-à-dire l'agencement tridimensionnel local des acides aminés –, et d'autre part des éléments directement impliqués dans le comportement des protéines au sein de l'espace cellulaire et conditionnant cet agencement local, comme par exemple la solubilité ou encore l'insertion en membrane.

2.2.1. *Structure secondaire*

Tout d'abord, la proportion de structures secondaires présentes au sein des protéines d'intérêt a été estimée suivant le système appelé « DSSP »⁴ [4]. Celle-ci correspond à la quantité d'acides aminés impliqués dans une hélice 3_{10} , α ou π ⁵, un coude, un pont ou un feuillet β ⁶, une région coudée⁷ ou une pelote aléatoire⁸. Cette information renseigne sur l'appartenance à l'une des grandes classes de structure : tout- α , tout- β , α/β , $\alpha+\beta$, μ , σ ou ρ ⁹ [5,6]. C'est le programme

⁴ « Define Secondary Structure of Proteins ». Il est à noter que, l'établissement de ce classement se basant sur l'arrangement des liaisons hydrogène (ponts H) entre les acides aminés, deux résidus adjacents doivent former le même type de structure. Il en résulte que les hélices et les feuillets doivent avoir une longueur minimale raisonnable.

⁵ Hélices comportant respectivement 3, 4 et 5 résidus au minimum.

⁶ Structure comportant respectivement un seul pont H réparti entre 4 à 6 résidus, deux ponts H entre 2 segments discontinus de 3 résidus et plusieurs ponts H répartis entre plusieurs brins β .

⁷ Région dont la courbure n'implique aucun pont H.

⁸ Structure non périodique ne correspondant à aucune des autres structures secondaires.

⁹ Respectivement majoritairement des hélices α , majoritairement des feuillets β , une succession d'hélices α et de feuillets β , une juxtaposition de régions en hélices α et en feuillets β , une structure multi-domaines, une petite protéine, un peptide.

NPS@ secondary structure prediction tool (Institut de Biologie et Chimie des Protéines, Université Lyon I – Claude Bernard, France) qui a été utilisé pour réaliser cette estimation [7].

2.2.2. Solubilité, localisation et adressage

Ensuite, le caractère soluble ou membranaire des protéines d'intérêt a été investigué. Les programmes suivants ont été exploités : **ESPRESSO** (Computational Biology Research Consortium, Japon), **SCRATCH SOLpro tool** (Donald Bren School of Information and Computer Sciences, University of California at Irvine, USA) et **SPpred** (Bioinformatics Centre, Institute of Microbial Technology, Inde) [8,9].

Parallèlement, la localisation dans la cellule des protéines d'intérêt a été identifiée via les programmes suivants¹⁰ : **iLoc** (JCI BioInfo Lab, Jingdezhen Ceramic Institute, Chine), **LocTree3** (RostLab, Technische Universität München, Allemagne), **ProtComp 9.0** (Softberry Inc., USA) et **PSORT** (Laboratory of Functional Analysis *in silico*, University of Tokyo, Japon) [10–13].

La présence d'un signal d'adressage a, quant à elle, été prédite à l'aide des programmes suivants¹¹ : **PrediSi** (Institute for Microbiology, Technical University of Braunschweig, Allemagne), **PSORT**, **SignalP 4.1** (Center for Biological Sequence Analysis, Technical University of Denmark, Danemark) et **TargetP 1.1** (Center for Biological Sequence Analysis) [13–17].

2.2.3. Insertion et organisation en membrane

Finalement, l'outil **SCRATCH ABTMpro tool** a été utilisé pour prédire l'insertion en membrane (α ou β) [9]. Subséquemment, deux séries de programmes ont été utilisées pour prédire la présence soit d'un tonneau β (TMBB), soit d'hélices α transmembranaires (TMH). La modélisation en TMBB a été réalisée via **BOMP** (Computational Biology Unit, University of Bergen, Norvège) et **PRED-TM $\beta\beta$** (Biophysics & Bioinformatics Laboratory, University of Athens, Grèce) [18,19]. L'éventuelle présence de TMH a été vérifiée via la modélisation de profils d'hydropathie grâce à quinze programmes : **DAS** (IMP Bioinformatics Group, Research Institute of Molecular Pathology, Autriche), **ExPASy TMpred tool**, **HMMTOP** (Institute of Enzymology, Hungarian Academy of Sciences, Hongrie), **OCTOPUS** (Stockholm Bioinformatics Center, Stockholm University, Suède), **NPS@ PHDhtm tool**, **Philius** (Yeast Resource Center, University of Washington, USA), **Phobius** (Stockholm Bioinformatics Center), **PolyPhobius** (Stockholm Bioinformatics Center), **SCAMPI** (Stockholm Bioinformatics Center), **SOSUI** (Nagahama Institute of Bio-Science and Technology, Japon), **SPLIT 4.0** (Biophysics Laboratory, University of Split, Croatie), **SPOCTOPUS** (Stockholm Bioinformatics Center), **TM-Finder** (SickKids, Toronto University, Canada), **TMHMM** (Center for Biological Sequence Analysis, Technical University of Denmark, Danemark), **TopPred** (Biology IT Center, Institut Pasteur & Ressource Parisienne en Bioinformatique Structurale, Université Paris VII – Diderot, France) [20,21,30–32,22–29]. Il est à noter que 5 des programmes ci-dessus (**Philius**, **Polyphobius**, **OCTOPUS**, **SCAMPI** et **SPOCTOPUS**) ont été utilisés via la plateforme **TOPCONS** (Stockholm Bioinformatics Center). Il est à noter encore que les profils d'hydropathie obtenus incluent également l'orientation en membrane des extrémités N- et C-terminales ainsi que des segments non membranaires.

¹⁰ Ces programmes se basent sur des informations de propriétés (séquence en acides aminés), de similarité (homologie de séquence et/ou de fonction), de structure (segments transmembranaires), de fonction (séquences signalétiques) et d'évolution (ontologie génétique) issues des bases données alimentées par l'expérience [10–13].

¹¹ Ces programmes se basent sur des données expérimentales portant sur la reconnaissance de peptides signaux, de sites de clivage, de signaux de sécrétion et/ou de segments transmembranaires [13–17].

2.3. Organisation 3D

2.3.1. Généralités

La structure tertiaire d'une protéine correspond à sa structure 3D globale. C'est l'organisation « 3D » d'un polypeptide qui établit le site actif et lui confère sa fonction.

Ce niveau de structuration peut être approché de deux manières :

- expérimentalement, par exemple via la cristallographie par diffraction de rayons X (XRD) ou par la résonance magnétique nucléaire (RMN) ;
- théoriquement, c'est-à-dire en modélisant *in silico* la protéine d'intérêt.

Dans la suite du travail, nous nous concentrerons exclusivement sur la modélisation *in silico*.

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées afin d'approcher la structure 3D théorique d'une protéine [33–35]. La plus simple correspond à la modélisation comparative, c'est-à-dire l'utilisation de structures déjà résolues (expérimentalement) comme point de départ [36,37]. Cet ensemble de méthodes est applicable en raison du nombre limité de repliements (*folds*) que peuvent adopter les protéines en regard du nombre virtuellement illimité de séquences. Deux approches fondamentales peuvent être distinguées :

- la modélisation par homologie, basée sur la similarité de séquence chez des protéines homologues¹² ;
- la reconnaissance de conformation (« *fold recognition* » ou « *threading* »), basée sur une approche 1D-3D, c'est-à-dire la compatibilité entre une séquence en acides aminés et une structure tridimensionnelle.

Un autre ensemble de méthodes correspond à la modélisation *de novo* ou *ab initio*, c'est-à-dire à partir de la structure primaire seule et des propriétés physicochimiques de ses composants. Deux grandes tendances sont observées : les méthodes dites *energy and fragment-based* et les méthodes basées sur la variation co-évolutive [38–40].

2.3.2. Méthodologie appliquée

La première étape de la modélisation des protéines d'intérêt a consisté en la recherche des domaines présents au sein de la structure à l'aide de la base de données **Pfam** (European Molecular Biology Laboratory, European Bioinformatics Institute, Royaume-Uni), c'est-à-dire la ou les région(s) fonctionnelle(s) constituant celle-ci [41,42]. Cette étape a par la suite permis d'orienter la modélisation comparative et *de novo/ab initio*.

Une fois ces domaines identifiés, la deuxième étape a correspondu à la modélisation comparative :

- par homologie¹³ de l'ensemble ou d'une partie de la structure des protéines d'intérêt, via le programme **ESyPred3D 1.0** (Unité de Recherche en Biologie des Microorganismes, Université de Namur, Belgique) [43] ;

¹² Protéines codées par des gènes ayant une origine commune. Leurs séquences en acides aminés sont similaires et leurs structures 3D proches.

¹³ Il est à noter que la modélisation par homologie n'est possible qu'au-delà de 30 % d'identité de séquence entre la protéine d'intérêt et celle de référence [43].

- par reconnaissance de conformation via **Phyre 2** (Structural Bioinformatics Group, Imperial College London, Royaume-Uni) et **RaptorX** (Computational Institute, University of Chicago, USA) [44,45].

La troisième étape a été la modélisation *de novo/ab initio* des protéines d'intérêt, soit *in toto*, soit de certains éléments clés de la structure (notamment grâce aux informations fournies par la base de données **Pfam**). Les modèles présentés ont été prédits grâce au programme **Rosetta@home** (Bakerlab, University of Washington, USA) [46,47], exploité depuis la plateforme technologique de calcul intensif (PTCI) du Consortium des Équipements de Calcul Intensif (CÉCI). La robustesse des modèles prédits a par la suite été évaluée par un diagramme de Ramachandran construit grâce au programme **RAMPAGE** (Crystallography and Bioinformatics Group, University of Cambridge, Royaume-Uni) [48].

Une fois la structure 3D des protéines d'intérêt modélisée, la quatrième étape a requis leur insertion en membrane, ce qui a été réalisé via le programme **CHARMM-GUI** (Wonpillab, Lehigh University, USA) [49]. Des simulations de dynamique moléculaire (MD) ont ensuite pu être réalisées grâce au programme **GROMACS** (Science For Life Laboratory, Stockholm University and KTH, Suède & Uppsala Biomedical Centre, Suède) [50], exploité depuis la PTCI. Enfin, les résultats de MD ont été caractérisés par des diagrammes de RMSD/RMSF grâce au programme **KaleidaGraph** (Synergy Software Inc., USA).

Toutes les données générées ont été visualisées et analysées via les programmes **MacPyMOL** (Schrödinger Inc., USA) et **VMD** (Theoretical and Computational Biophysics Group, University of Illinois at Urbana-Champaign, USA) [51].

2.3.3. Paramètres utilisés

Modélisation *de novo/ab initio*. La modélisation via **Rosetta@home** constituant une part importante de notre méthodologie, nous décrivons brièvement ici les prérequis ainsi que les quelques manipulations pouvant mener à la structure 3D. Quatre types d'information sont requis avant d'entamer la modélisation proprement dite :

- la séquence de la protéine d'intérêt, obtenue expérimentalement ;
- une librairie de fragments¹⁴, fournie par **Robetta** (Bakerlab) [52] à partir de la séquence protéique ;
- le profil d'hydropathie¹⁵ de notre protéine, fourni par **OCTOPUS** ;
- le profil de lipophilicité¹⁶, fourni par **Rosetta@home** sur base de la séquence et du profil d'hydropathie.

Le modèle 3D est ensuite généré via le protocole « Membrane-abinitio2 ». La structure topologique calculée étant brute, il est nécessaire de l'affiner en y ajoutant les chaînes latérales des acides aminés par l'intermédiaire du protocole « Relax ». Il est éventuellement nécessaire de contraindre la structure afin de la faire correspondre à la protéine dans son environnement naturel (insertion dans la bicouche membranaire, présence d'un site actif dans le compartiment soluble, ...).

¹⁴ Cette librairie renseigne les propriétés des acides aminés et leur comportement par rapport à leur environnement immédiat.

¹⁵ Ce profil renseigne la localisation et l'orientation des hélices α transmembranaires par rapport à la séquence primaire.

¹⁶ Ce profil permet d'appréhender le caractère hydrophile ou lipophile de chaque résidu de la séquence (logP), plus particulièrement à l'interface entre la phase lipidique (membrane) et la phase aqueuse (compartiment soluble).

Dynamique moléculaire. Les modèles ainsi générés sont insérés dans une membrane par la méthode de remplacement (construction de la bicouche lipidique autour de la protéine) et orienté selon l'axe vertical. La membrane lipidique est constituée d'environ 170 molécules de 1-stéaroyl-2-linoléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (SLPC). Une couche de molécules d'eau est ensuite ajoutée de part et d'autre de la membrane pour une épaisseur de 17,5 Å, comprenant approximativement 26000 molécules. L'ensemble du système de simulation correspond donc à une boîte parallélépipédique de 10*12*12 nm. Le champ de force appliqué est « charmm36 » et les paramètres additionnels caractérisant les lipides sont ceux utilisés par défaut par le programme **CHARMM-GUI**. Le modèle utilisé pour décrire le solvant est « TIP3P » et les conditions de périodicité aux limites de la boîte sont appliquées dans toutes les directions.

2.4. Interactions enzyme-substrat

Les propositions d'amarrage moléculaire (« *docking* ») entre nos modèles et leurs substrats ont été fournies par le programme **GOLD** (Cambridge Crystallographic Data Centre, University of Cambridge, Royaume-Uni) [53]. Les acides aminés suivants ont permis de définir le site catalytique (tous font partie des 4 motifs conservés) : K¹²⁰, E¹²³, T¹²⁷, H¹⁴⁶, H¹⁴⁷, N¹⁷³, H¹⁷⁷, M¹⁸⁰, Y¹⁸¹, T²⁰³. Les acides γ -linolénique (C18:3n-6) et arachidonique (C20:4n-6) ont été choisis comme substrats (voir à ce sujet la Figure 1-9)¹⁷. Les itérations générées ont été classées en utilisant la fonction « GOLD score » et visualisées avec **MacPyMOL** et **VMD**.

3. Résultats & discussion

3.1. Modélisation de *pf*Δ6D

3.1.1. *Organisation 1D*

La structure primaire de la désaturase a été déterminée par traduction du code génétique à partir de la séquence en nucléotides isolée précédemment (Figure 3-2). Ainsi, *pf*Δ6D correspond à un ORF de 1338 paires de bases et à une protéine de 445 acides aminés ayant une masse moléculaire théorique de 51857 D et un point isoélectrique théorique de 8,4¹⁸. Ces données de séquences sont similaires à celles trouvées dans la littérature, puisque les Δ6 désaturases comprennent généralement entre 442 et 445 résidus – à l'exception des Salmonidés qui en comptent 454 [54]. Comme observé précédemment, l'alignement de notre séquence avec celles de désaturases d'autres poissons indique les différents motifs réputés conservés : un domaine cytochrome b₅ N-terminal (D³⁵...H⁷⁷), 4 hélices α ¹⁹ (C¹³⁶...W¹⁵⁶, T¹⁵⁸...G¹⁷⁸, Q²⁶³...Q²⁸³, F³⁰⁰...L³³⁰) et les 3 « boîtes His » (H¹⁸¹DFGH¹⁸⁵, H²¹⁸FQHH²²², Q³⁸³IEHH³⁸⁷) (Figure 3-5) [55,56]. De plus, il semblerait que le site actif de *pf*Δ6D – et des désaturases de manière générale – comprenne les 8 résidus histidine (dont un remplacé par une glutamine) des trois boîtes His conservées [57].

¹⁷ Les tests d'interaction enzyme-substrat n'ayant été effectués que pour l'élongase *pf*ELOVL5, seuls ses substrats sont mentionnés (voir point 3.1.3. pour les explications).

¹⁸ La littérature ne mentionne aucune donnée expérimentale de masse moléculaire ou de point isoélectrique pour les désaturases.

¹⁹ Renseignées dans la littérature mais sans preuves expérimentale ou théorique.

3.1.2. Organisation 2D

Structure secondaire. La structure secondaire correspond à la structure tridimensionnelle adoptée localement par la protéine, principalement due aux liaisons hydrogène établies entre les groupements amides et carbonyles de la chaîne principale. Dans le cas de *pf*Δ6D, 209 résidus sont impliqués dans des hélices α (41,80 %), 66 dans des feuillets β (14,83 %) et 178 dans des pelotes aléatoires (40,00 %). Les 15 résidus restant (3,37 %) sont « ambigus », c'est-à-dire que, sur base du consensus établi par le programme utilisé, il n'a pas été possible de les attribuer à l'une des 8 classes du système DSSP. Le résultat présenté ici renseigne avant tout sur la proportion de structures secondaires de notre protéine, majoritaire en hélices α , conformément à ce que l'on retrouve dans la littérature pour la grande famille des désaturases. Cette quantité est réputée impliquer au moins 30 % des résidus de la séquence [57–59].

Solubilité, localisation et adressage. Avant d'aller plus avant dans la résolution de la structure de *pf*Δ6D, il est nécessaire d'établir son caractère soluble ou membranaire. Pour ce faire, la solubilité a été calculée à partir de la séquence primaire et des propriétés intrinsèques des acides aminés la composant. Il en résulte que notre désaturase a été prédite comme étant insoluble, ce qui correspond aux données expérimentales relatives aux FED [60]. Cette protéine étant membranaire, il est attendu qu'elle s'insère dans une membrane biologique moyennant un peptide signal²⁰ et/ou un signal de rétention à l'organite²¹. En effet, *pf*Δ6D a été prédite comme appartenant au réticulum endoplasmique, ce qui est confirmé dans la littérature par des expériences d'immunofluorescence et de transfert protéique de type *western blot* [57,61]. Cependant, aucun peptide signal n'a pu être mis en évidence. Il est néanmoins connu que l'adressage en membrane de certaines types de protéines (notamment celles comprenant plusieurs TMH) peut être dirigé par un « signal hydrophobe » correspondant à la première hélice α insérée en membrane²² [62].

Insertion et organisation en membrane. Le caractère membranaire de *pf*Δ6D étant établi, il est maintenant nécessaire de préciser sa topologie (intrinsèque ou extrinsèque, monotopique ou polytopique²³). La configuration en tonneau β a été écartée à la fois par la modélisation et par la littérature : en effet, ce type de configuration spatiale se retrouve exclusivement chez les procaryotes et dans les membranes biologiques eucaryotes d'origine bactérienne (mitochondries et plastes) [58,63]. La configuration en hélices α transmembranaires a été investiguée grâce à la réalisation de profils d'hydropathie. La présence de plusieurs « éléments de structure transmembranaires » au sein de *pf*Δ6D a ainsi été identifiée. Leur nombre ne fait pas consensus : 8 programmes en renseignent 3 (DAS, PHD, SOSUI, SPLIT, TM-Finder, TMHMM, TMpred et TopPred) et les 7 autres en révèlent 4 (HMMTOP, OCTOPUS, Philius, Phobius, Polyphobius, SCAMPI et SPOCTOPUS) (Figure 4-1 ; Tableau 4-1). Si nous spécifions, pour chacun d'entre eux, la nature de ces « éléments structuraux » (segment, domaine, hélice²⁴, ...), 4 des 8 programmes modélisant une désaturase à 3 TMH (DAS, SPLIT, TM-Finder et TMHMM) indiquent un double pic à l'endroit du premier domaine hydrophobe (Figure 4-1B). Ceci peut s'expliquer par l'existence d'une courte séquence hydrophile (1-6 acides aminés) au milieu d'une longue séquence hydrophobe (21-38 acides aminés), là où les programmes prédisent

²⁰ Portion de séquence (entre 15 et 30 acides aminés) reconnue par le système de translocation.

²¹ Séquence de quelques acides aminés de l'extrémité C-terminale reconnue par l'organite dont il est question.

²² La littérature ne mentionne aucune donnée expérimentale de peptide signal pour les désaturases.

²³ Respectivement protéine intégrée à la membrane, associée à l'un des feuillets membranaires, en contact avec un seul des compartiments définis par la membrane, en contact avec les deux compartiments définis par la membrane.

²⁴ Respectivement une portion de séquence de la protéine considérée (1D), une région de la protéine considérée (3D) et un type de structure secondaire (2D).

une gamme de longueurs respectives de 13-24 et 18-32 acides aminés pour les TMH 2 et 3. Il y aurait donc une corrélation entre la taille de ce « lien » et la « sensibilité » des programmes utilisés.

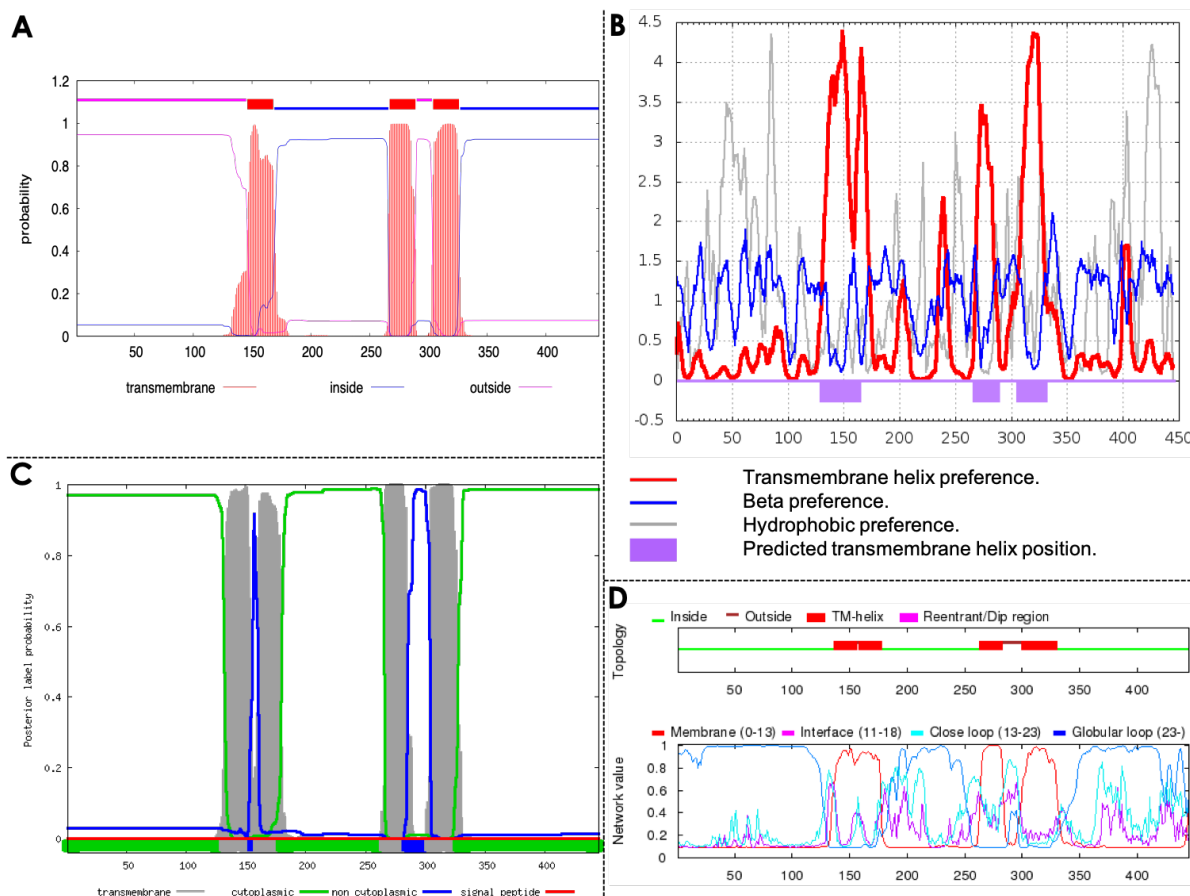


Figure 4-1. Profil d'hydropathie de *pfΔ6D*. **A** – TMHMM ; **B** – SPLIT ; **C** – Phobius ; **D** – OCTOPUS.

Tableau 4-1. Profils d'hydropathie de *pfΔ6D*.

Programme	TMH#1*	TMH#2	TMH#3	TMH#4
DAS	133-170		270-282	308-329
PHD	136-160		271-288	313-330
SOSUI	131-153		167-289	301-323
SPLIT	130-164		267-288	306-330
TM-Finder	137-174		293-304	316-339
TMHMM	146-168		267-289	304-326
TMpred	141-164		267-289	307-327
TopPred	137-157		265-285	310-330
HMMTOP	125-144	151-170	266-285	308-327
OCTOPUS	136-156	158-178	263-283	300-330
Philius	132-153	158-179	265-285	302-327
Phobius	132-155	161-179	266-284	304-327
Polyphobius	132-155	159-179	266-289	303-328
SCAMPI	130-151	152-173	265-286	307-328
SPOCTOPUS	131-152	153-174	264-285	297-328

* Numéro des résidus.

Afin de tester cette hypothèse, la sous-unité $\alpha 1$ du récepteur à la glycine (2M6B)²⁵ a été utilisée. Il s'agit d'un polypeptide à 4 hélices α transmembranaires, dont au moins une connexion entre deux hélices est courte (moins de 6 acides aminés). Ici aussi, les profils d'hydropathie ne font pas consensus : 3 ou 4 TMH (Tableau 4-2). Si la boucle non membranaire comprise entre les acides aminés 33 et 36 est « allongée » (entre le 36^e et le 37^e) avec des acides aminés très hydrophiles sur l'échelle de Kyte-Doolittle (EQDNKR) [64], le modèle à 4 hélices est largement prédominant. Par contre, si ce sont des résidus très hydrophobes (IVLFCM) qui sont impliqués, c'est le modèle à 3 TMH qui devient majoritaire. Ceci conforte notre hypothèse et nous pouvons conclure que *pf* $\Delta 6D$ est une protéine à 3 domaines transmembranaires. Le premier est constitué d'une « α helical hairpin », c'est-à-dire deux hélices α reliées par un coude, et les deux suivants d'une seule TMH, portant le nombre de celles-ci à 4. Concernant l'orientation des différents éléments solubles, les extrémités N- et C-terminales ainsi que le « segment globulaire » entre les TMH 2 et 3 sont orientés vers le cytosol, tandis que les segments reliant les TMH 1 et 2, ainsi que 3 et 4, se trouvent dans la lumière du réticulum endoplasmique (Figure 4-2). Ce modèle est confirmé par des éléments expérimentaux issus de la littérature : synthèse des précurseurs dans le cytoplasme, localisation des cofacteurs (cytochrome b_5 et NADH-cytochrome b_5 réductase) sur la face cytoplasmique du RE, preuve d'une inhibition de l'activité enzymatique à l'extérieur du RE [62,65,66].

Tableau 4-2. Profils d'hydropathie de 2M6B.

Programme		+ 36< Φ > ³⁷	+ 36<EQDNKR> ³⁷	+ 36<IVLFCM> ³⁷
HMMTOP	TMH#1		13-32	
	TMH#2	6-30	45-62	17-41
	TMH#3	72-92	77-96	72-91
	TMH#4	117-136	123-140	123-142
OCTOPUS	TMH#1		10-31	
	TMH#2	9-30	44-65	10-31
	TMH#3	71-92	76-96	75-96
	TMH#4	115-136	121-142	119-140
TMHMM	TMH#1		10-32	
	TMH#2	7-29	45-62	7-29
	TMH#3	71-93	77-99	74-96
	TMH#4	114-133	120-139	117-136
TMpred	TMH#1	13-30	13-30	
	TMH#2	36-56	42-62	17-41
	TMH#3	65-85	71-91	71-91
	TMH#4	116-132	120-138	120-138

3.1.3. Organisation 3D

Domaines fonctionnels. Nous avons entamé la résolution de la structure 3D de *pf* $\Delta 6D$ par la recherche des domaines fonctionnels. Deux d'entre eux ont été identifiés :

- Cyt- b_5 (PF00173), qui correspond au cytochrome b_5 fusionné à l'extrémité N-terminale de notre séquence (D³⁵...H⁷⁷) ;
- FA_desaturase (PF00487), qui correspond à la fonction désaturase et qui couvre l'ensemble de la séquence à l'exception de l'extrémité N-terminale.

²⁵ 2M6B a été trouvée à partir de la banque de données PDBTM (<http://pdbtm.enzim.hu/>) sur base du critère suivant : une seule chaîne contenant des TMH, plus particulièrement 4 (34 résultats trouvés).

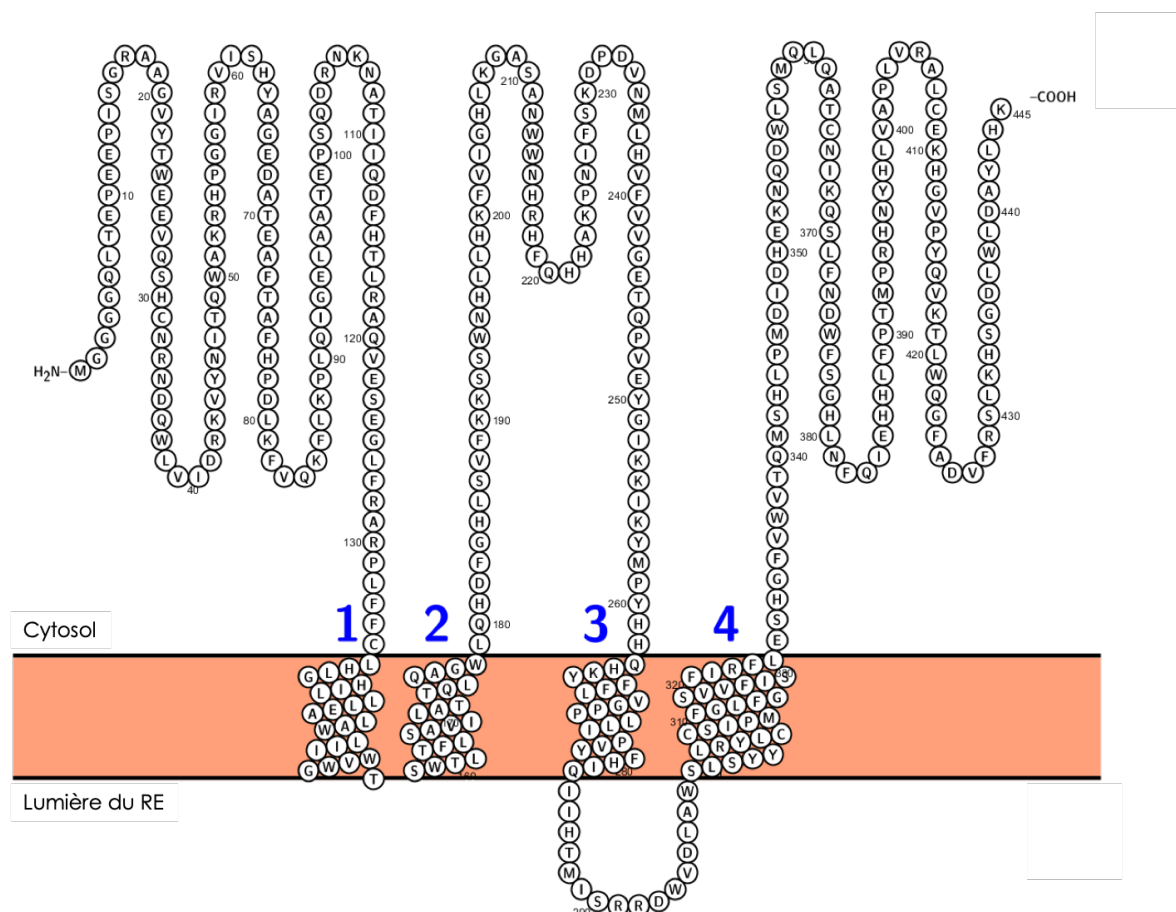


Figure 4-2. Modèle théorique 2D de pfΔ6D (<http://wlab.ethz.ch/protter/start/>).

Modélisation par homologie. Seul le domaine cytochrome b_5 présente des homologues dans la PDB et permet une modélisation comparative par homologie. Pour ce faire, différents « templates²⁶ », d'origines variées, ont été utilisés (Tableau 4-3). Ils présentent une identité de séquence comprise entre 37 et 45 % pour le domaine concerné, ce qui est suffisant pour une telle modélisation (30 % minimum). La superposition des templates et des modèles²⁷ donne des RMSD²⁸ compris entre 0,19 et 0,38 Å, ce qui indique une bonne adéquation entre les deux structures (Tableau 4-3). Cependant, on remarquera dans certains modèles la faible résolution du feuillet β (Figure 4-3A & C), voire l'absence totale de celui-ci (Figure 4-3B).

Tableau 4-3. Homologues PDB du domaine Cyt- b_5 de pfΔ6D.

# PDB	Type	Origine	Identité*	RMSD**
1CYO	Microsomal	<i>Bos taurus</i>	40 %	0,32 Å
1DO9	Soluble	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	37 %	0,21 Å
1MJ4	Sulfite oxydase	<i>Homo sapiens</i>	45 %	0,38 Å
3LF5	NADH réductase	<i>Homo sapiens</i>	37 %	0,23 Å
3NER	Microsomal	<i>Homo sapiens</i>	37 %	0,19 Å

* Calculée par <http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html>.

** Calculée par MacPyMOL.

²⁶ Le terme « template » est utilisé dans l'ensemble de ce travail pour se référer à une structure existante, répertoriée dans une base de données et utilisée comme référentiel lors d'une étape de modélisation.

²⁷ Le terme « modèle » est utilisé dans l'ensemble de ce travail pour se référer à une structure prédite correspondant au résultat d'une étape de modélisation.

²⁸ Déviation standard entre deux acides aminés occupant la même position dans des structures homologues.

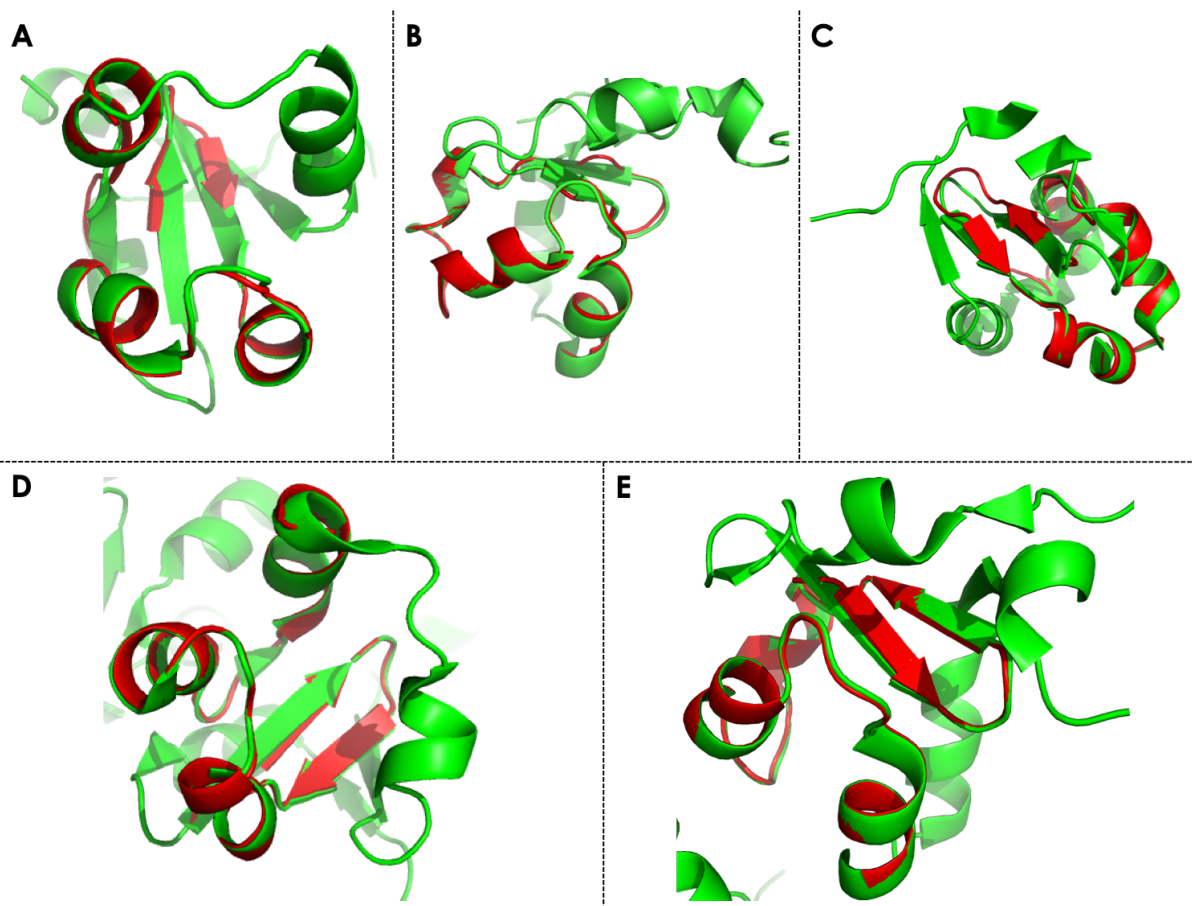


Figure 4-3. Modèles obtenus par homologie pour le domaine Cyt- b_5 de *pfΔ6D*. **A** – 1CYO ; **B** – 1DO9 ; **C** – 1MJ4 ; **D** – 3LF5 ; **E** – 3NER. Vert, *template* PDB ; rouge, modèle ESyPred3D.

Modélisation par reconnaissance de conformation. Étant donné l'absence d'homologues pour l'ensemble de la protéine dans la PDB, *pfΔ6D* a été modélisée *in toto* par reconnaissance de conformation (Figure 4-4). Les résultats obtenus grâce aux programmes **Phyre 2** et **RaptorX** peuvent se répartir en deux groupes.

- Le premier regroupe les modèles basés sur une conformation cytochrome (b_5 -like ou flavocytochrome b_2). Ne prenant en compte que 10-12 % de la séquence totale de notre protéine (là où 30 % sont nécessaires pour valider une conformation), ces modèles présentent de nombreuses aberrations. Ainsi, à titre d'exemple, « 1LCO » inclut un pseudo-tonneau β en milieu de structure – les feuillets β sont réputés être présents uniquement au niveau du motif cytochrome b_5 et les tonneaux β uniquement chez les protéines d'origine bactérienne (Figure 4-4A). Ces modèles ne peuvent donc être retenus.
- Le second regroupe quant à lui tous les modèles basés sur d'autres conformations non corrélées à notre protéine – en grande partie à cause de la faible longueur du segment considéré (entre 2 et 19 % de la séquence totale).

A la suite de la publication de deux structures cristallographiques de la stéaryl-CoA désaturase (SCD/ $\Delta 9D$) chez *M. musculus* (4YMK) et *Homo sapiens* (4ZYO) dans le courant de l'année 2015 [67,68], une seconde étape de modélisation par reconnaissance de conformation²⁹ a été réalisée. Les résultats obtenus, quel que soit le programme utilisé, incluent les groupes de modèles

²⁹ Une étape de modélisation par homologie a préalablement été effectuée mais n'a donné aucun résultat, l'identité de séquence entre les SCD/ $\Delta 9D$ et *pfΔ6D* s'élevant à moins de 15 %.

identifiés, auxquels il faut adjoindre un dernier comportant les deux structures expérimentales dont il est question. Il y a donc bien reconnaissance de la conformation. Ces deux modèles ne peuvent cependant pas être validés tels quels – en raison notamment d'approximations concernant la localisation des 4 TMH et des 3 boîtes His ainsi que de la faible homologie (moins de 15 %) (Figure 4-4B). Néanmoins, les structures cristallographiques des SCD/ $\Delta 9D$ ont pu être utilisées dans le cadre de la méthode *de novo/ab initio*.

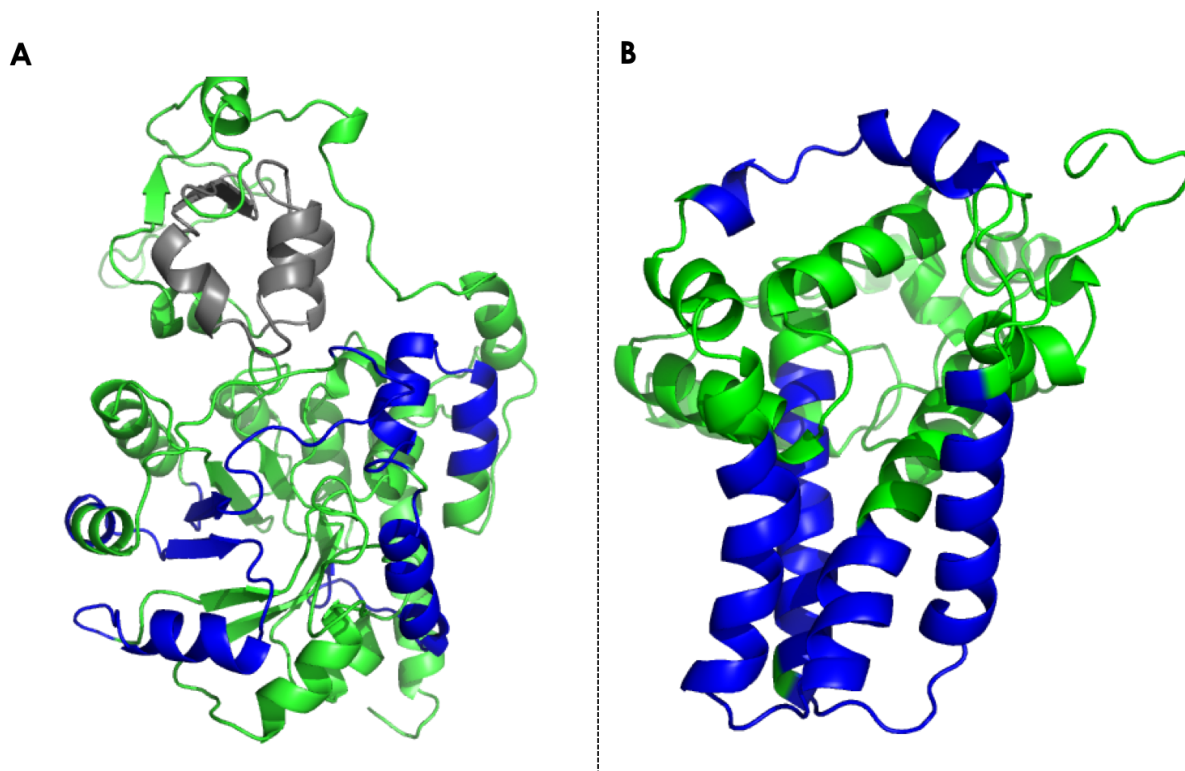


Figure 4-4. Résultat de modélisation par reconnaissance de conformation pour *pfΔ6D*. **A** – Modélisation d'après 1LCO ; **B** – Modélisation d'après 4ZYO. Bleu, hélices α transmembranaires ; gris, domaine cytochrome b_5 .

Modélisation *de novo/ab initio*. La modélisation comparative n'ayant pas fourni de résultats probants, la méthode *de novo/ab initio* a donc été utilisée. Les données expérimentales (séquence) et théoriques (fragments, hydropathie et lipophilicité) ont permis la construction d'un modèle de *pfΔ6D* (Figure 4-5). S'agissant d'une « forme brute », c'est-à-dire ne prenant en compte que la chaîne principale, il est nécessaire d'ajouter la contribution des chaînes latérales de chacun des résidus en relaxant sa structure (Figure 4-6). Ce modèle présente néanmoins de nombreux défauts :

- une mauvaise résolution des hélices α transmembranaires (présence d'un segment désordonné, hélice à moitié dans la membrane et hors de celle-ci, ...)
- une mauvaise localisation des 3 boîtes His (distance largement supérieure à 5 Å rendant impossible la formation d'un site catalytique actif) [69,70] ;
- une occupation de l'espace dédié à la membrane par des éléments solubles (notamment en raison de la localisation des TMH).

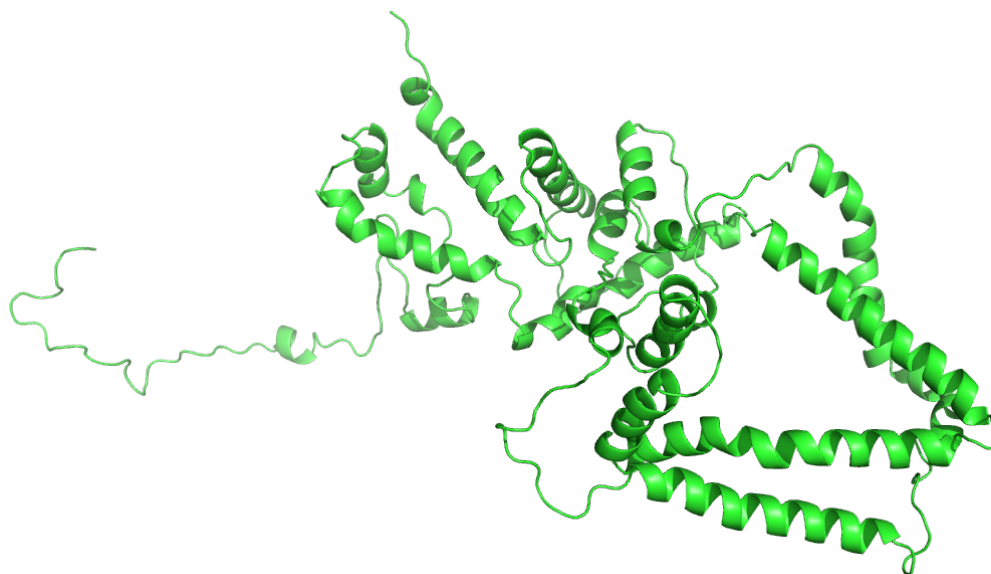


Figure 4-5. Structure 3D théorique de *pfΔ6D* modélisée par Rosetta – Structure brute.

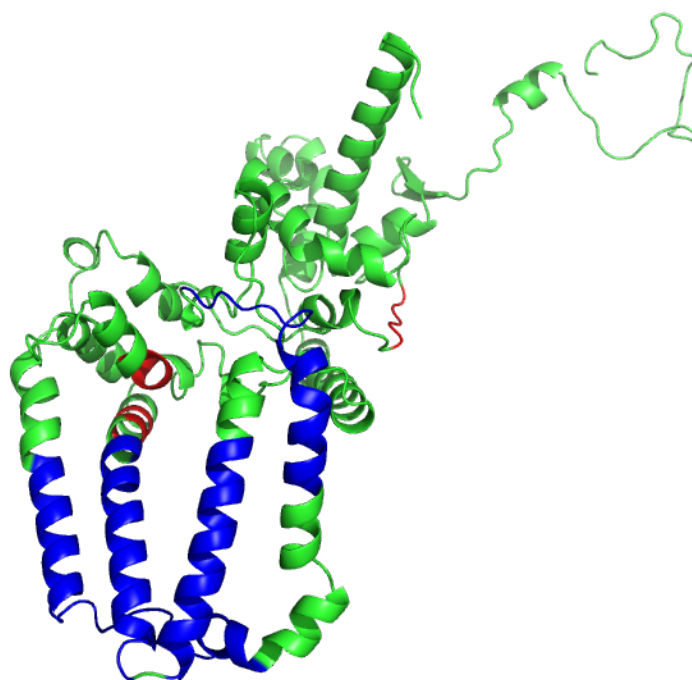


Figure 4-6. Structure 3D théorique de *pfΔ6D* modélisée par Rosetta – Structure relaxée. Bleu, hélices α transmembranaires ; rouge, boîtes Histidine.

A côté de la prédiction *in toto*, c'est-à-dire de l'entièreté des 445 résidus composant notre protéine, plusieurs variantes simplifiées ont été utilisées afin de faciliter la modélisation d'un système aussi gros et complexe : sans l'extrémité N-terminale, sans la C-terminale, sans les deux extrémités, région membranaire seule, domaine « globulaire » seul, ... Cependant, les éléments critiques impliqués d'une part dans la composition du site actif et d'autre part dans la sélectivité du substrat étant répartis sur l'ensemble de la séquence, il s'avère préférable de ne retenir comme base à la modélisation que la situation *in toto*. Une condition supplémentaire qu'il est possible d'apporter à la modélisation afin d'améliorer la qualité de la prédiction est l'utilisation de « contraintes », telles que la distance séparant deux résidus. C'est ce qui est présenté à la Figure 4-7, dans laquelle la contrainte implémentée porte sur la localisation dans l'espace des 3 boîtes

His (estimée à environ 5 Å d'après un screening de la PDB³⁰). Cette prédiction comporte cependant les mêmes faiblesses que la précédente.

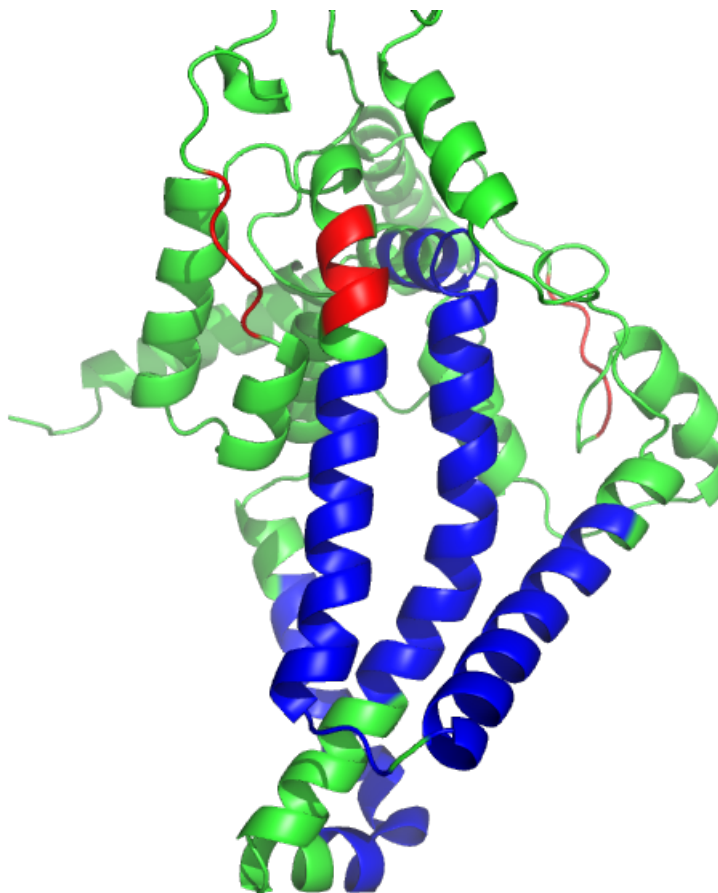


Figure 4-7. Structure 3D théorique de *pfΔ6D* modélisée par Rosetta – Structure contrainte. Bleu, hélices α transmembranaires ; rouge, boîtes Histidine.

Suite à la cristallisation des deux SCD/ $\Delta 9D$, une nouvelle série de modélisations utilisant 4ZYO comme *template* a été réalisée. A nouveau, une étape de « contrainte » portant sur la localisation dans l'espace des 3 boîtes His a été ajoutée. La distance les séparant ayant été graphiquement évaluée à une dizaine d'ångströms sur base de la structure 3D de 4ZYO, trois conditions ont été testées : 5 Å (correspondant à l'espace minimum pouvant être occupé par trois groupements histidine chélatant deux ions ferriques), 10 Å (distance inférée à partir de 4ZYO) et 15 Å (distance maximale au-delà de laquelle la contrainte serait impossible à respecter). Malgré cette diversité de conditions, les prédictions obtenues ne satisfont toujours pas l'organisation spatiale attendue, tant du point de vue de la localisation des hélices α transmembranaires que de celle des boîtes His. Il apparaît ici clairement que *pfΔ6D* est un système bien trop gros (445 résidus) et complexe (domaine globulaire non contraint de 85 acides aminés, moins de 25 % d'éléments membranaires – donc « naturellement » contraints) pour le protocole de modélisation *de novo/ab initio* de **Rosetta@home**. Ayant largement éprouvé les limites de ce programme, il ne nous semble techniquement pas possible de fournir un modèle valable de notre désaturase.

³⁰ La recherche a porté sur des protéines tout- α comprenant plusieurs TMH et cristallisées en présence de fer. Parmi les résultats obtenus, ont été retenues les structures impliquant plusieurs groupements histidine, comme par exemple la chémotaxine DcrH de *Desulfovibrio vulgaris* (2AWC) ou encore la ferritine FtnA de *Pseudomonas aeruginosa* (3R2L).

3.2. Modélisation de *pfELOVL5*

3.2.1. *Organisation 1D*

La séquence en acides aminés de l'élongase ayant été déterminée précédemment (Figure 3-3), *pfELOVL5* correspond à un ORF de 885 paires de bases et à une protéine de 294 acides aminés ayant une masse moléculaire théorique de 35134 D et un point isoélectrique théorique de 9,4³¹. Ces données de séquences sont similaires à celles trouvées dans la littérature, puisque les élongases comprennent généralement entre 288 et 295 résidus chez les poissons [71]. Comme observé précédemment, l'alignement de notre séquence avec celles d'élongases d'autres poissons indique les différents motifs réputés conservés : plusieurs hélices α ³² (N³¹...K⁵¹, L⁶⁵...T⁸⁵, I¹⁰⁹...F¹²⁹, F¹⁴¹...V¹⁶¹, G¹⁶⁹...I¹⁸⁹, Y²⁰¹...A²²¹, K²²⁹...F²⁴⁹), un signal de rétention au RE (K²⁸⁹KLR²⁹²) et les 4 motifs conservés (boîte KEDT, K¹²⁰LIEFMDT¹²⁷ ; boîte His, Q¹³⁸MTFLHIYHH¹⁴⁷ ; boîte Tyr, N¹⁷³SFVHVVMYSYY¹⁸⁴ ; boîte Gln, T²⁰³QLQLIQ²⁰⁹) – par ailleurs supposés être impliqués dans le site actif (Figure 3-7) [72–74].

3.2.2. *Organisation 2D*

Structure secondaire. 113 résidus sont impliqués dans des hélices α (38,44 %), 52 dans des feuillets β (17,69 %) et 120 dans des pelotes aléatoires (40,82 %), les 9 résidus restant (3,06 %) étant « ambigus ». Notre protéine adopte donc une structure secondaire majoritairement en hélices α , conformément à ce que l'on retrouve dans la littérature pour la grande famille des élongases [72,75].

Solubilité, localisation et adressage. Conformément aux données de la littérature relatives aux élongases ELOVL [71,73], *pfELOVL5* a été prédite comme étant insoluble – et donc membranaire. De plus, il s'avère qu'elle se localise au sein du réticulum endoplasmique, ce qui est confirmé par des expériences d'immunofluorescence et de cinétique enzymatique [76,77], ainsi que par la présence d'un signal de rétention au réticulum (K²⁸⁹Kxx²⁹²) [72,75]. Cependant, aucun peptide signal n'a pu être mis en évidence. Comme pour *pfΔ6D*, il est probable que l'adressage en membrane soit dirigé par un « signal hydrophobe » correspondant à l'une des deux premières TMH³³ [77].

Insertion et organisation en membrane. Au niveau topologique, la conformation en tonneau β a été écartée par la modélisation. La littérature indique d'ailleurs que ce type de configuration spatiale se retrouve exclusivement chez les procaryotes et dans les membranes biologiques eucaryotes d'origine bactérienne (mitochondries et plastes) [63,78]. Concernant la conformation en hélices α , les profils d'hydropathie indiquent la présence de plusieurs TMH au sein de *pfELOVL5*. Leur nombre fait majoritairement consensus : 12 programmes sur les 15 utilisés en renseignent 7, alors que les 3 autres en indiquent 2, 5 ou 6 (Figure 4-8 ; Tableau 4-4). Nous pouvons donc conclure que *pfELOVL5* est une protéine à 7 domaines transmembranaires, chacun comportant une hélice α . Bien qu'il n'y ait pas de consensus dans la littérature [72,79], il est communément admis que les élongases ont un nombre de TMH compris entre 5 et 7 [76,80] – chiffres qui correspondent en effet à plus de 90 % de nos résultats théoriques (Tableau 4-5). Au niveau de l'orientation des différents éléments solubles, l'extrémité N-terminale ainsi que les segments TMH 2-3, 4-5 et 6-7 sont orientés vers la lumière du réticulum endoplasmique, alors

³¹ La littérature ne mentionne aucune donnée expérimentale de masse moléculaire ou de point isoélectrique pour les élongases.

³² Renseignées dans la littérature mais sans preuves expérimentale ou théorique.

³³ La littérature ne mentionne aucune donnée expérimentale de peptide signal pour les élongases.

que l'extrémité C-terminale ainsi que les segments TMH 1-2, 3-4 et 5-6 se trouvent dans le cytosol (Figure 4-9). Notre modèle est par ailleurs confirmé par des éléments expérimentaux issus de la littérature : synthèse des précurseurs dans le cytoplasme, localisation des cofacteurs (cytochrome b_5 et NADH-cytochrome b_5 réductase) sur la face cytoplasmique du RE, preuve d'une inhibition de l'activité enzymatique à l'extérieur du RE [66,76,77].

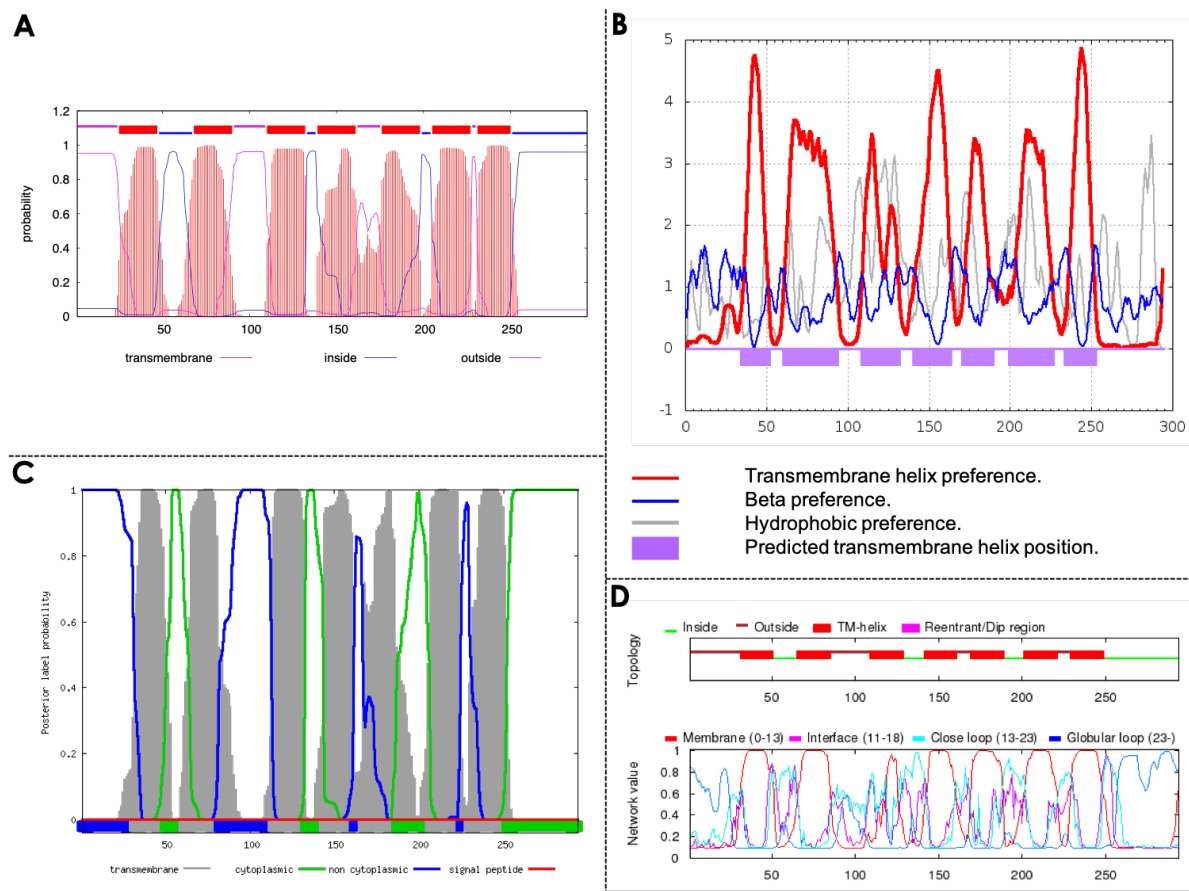


Figure 4-8. Profil d'hydropathie de *pELOVL5*. **A** – TMHMM ; **B** – SPLIT 4.0 ; **C** – Phobius ; **D** – OCTOPUS.

Tableau 4-4. Profils d'hydropathie de *pELOVL5*.

Programme	TMH#1*	TMH#2	TMH#3	TMH#4	TMH#5	TMH#6	TMH#7
SOSUI	31-52	65-87	---	---	---	---	---
SCAMPI	28-49	64-85	112-133	---	---	201-222	231-252
DAS	35-48	64-87	---	150-158	175-186	208-216	237-251
PHD	33-50	67-86	112-129	146-163	168-186	204-221	232-249
SPLIT	35-51	61-93	109-131	141-163	171-189	200-226	234-252
TM-Finder	39-48	65-91	110-130	146-156	175-184	205-218	235-250
TMHMM	25-47	68-90	110-132	139-161	176-198	205-227	231-250
TMpred	34-50	64-87	109-132	148-169	175-198	201-227	232-253
TopPred	31-51	61-81	115-135	146-166	172-192	205-225	234-254
HMMTOP	33-50	63-81	112-131	144-161	174-192	205-223	232-251
OCTOPUS	31-51	65-85	109-129	141-161	169-189	201-221	229-249
Philius	32-51	64-85	113-133	143-164	175-198	207-228	234-254
Phobius	32-49	61-81	114-132	144-161	167-186	207-224	230-251
Polyphobius	31-50	62-82	113-133	144-162	167-190	202-224	230-252
SPOCTOPUS	30-51	64-85	109-130	142-163	170-191	204-225	229-250

* Numéro des résidus.

Tableau 4-5. Nombre d'hélices α transmembranaires d'ELOVL5 recensé dans la littérature.

# TMH	Références	Espèces
2	Hastings <i>et al.</i> , 2005	<i>Salmo salar</i> *
4	Gregory <i>et al.</i> , 2010	<i>Thunnus maccoyii</i> *
5	Zheng <i>et al.</i> , 2009 Kim <i>et al.</i> , 2012 Morais <i>et al.</i> , 2009 Carmona-Antoñanzas <i>et al.</i> , 2013 Yamamoto <i>et al.</i> , 2010 Toke & Martin, 1996	<i>Rachycentron canadum</i> * <i>Acanthopagrus schlegelii</i> * <i>Salmo salar</i> * <i>Esox lucius</i> * <i>Nibea mutsukurii</i> * <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
5-6	Oh <i>et al.</i> , 1997 Jakobsson <i>et al.</i> , 2006 Tvrdik <i>et al.</i> , 2000	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Mammifères <i>Mus musculus</i>
5-7	Monné <i>et al.</i> , 1999 Uttaro, 2006	<i>Mus musculus</i> Divers protozoaires
6	Alimuddin <i>et al.</i> , 2008	<i>Oncorhynchus mykiss</i> *
7	Blacklock <i>et al.</i> , 2008 Mohd-Yusof <i>et al.</i> , 2010 Vrinten <i>et al.</i> , 2010 Hernandez-Buquer & Blacklock, 2013 Denic & Weissman, 2007	<i>Dictyostelium discoideum</i> <i>Lates calcarifer</i> * <i>Phytophthora infestans</i> <i>Pytium irregulare</i> <i>Dictyostelium discoideum</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
7-9	Meyer <i>et al.</i> , 2004	<i>Ciona intestinalis</i> <i>Oncorhynchus mykiss</i> * <i>Ostreococcus tauri</i> <i>Thalassiosira pseudonana</i> <i>Xenopus laevis</i>
Ø	Agaba <i>et al.</i> , 2004 Agaba <i>et al.</i> , 2005 Bell & Tocher, 2009	<i>Danio rario</i> * <i>Clarias gariepinus</i> * <i>Gadus morhua</i> * <i>Oreochromis niloticus</i> * <i>Scophthalmus maximus</i> * <i>Sparus aurata</i> * Divers procaryotes et eucaryotes

* Poissons.

3.2.3. Organisation 3D

Domaines fonctionnels. Contrairement à *pf*Δ6D, un seul domaine Pfam a été identifié : ELO (PF01151), qui correspond à la fonction « élongase ».

Modélisation par homologie. La PDB ne comprenant aucun homologue d'élongase, il n'a pas été possible d'utiliser la modélisation par homologie.

Modélisation par reconnaissance de conformation. *pf*ELOVL5 a donc été modélisée *in toto* par reconnaissance de conformation (Figure 4-10). Les résultats donnés par les programmes **Phyre 2** et **RaptorX** se basent soit sur des familles non apparentées à notre protéine (Figure 4-10A), soit sur le domaine membranaire du complexe respiratoire I, c'est-à-dire la NADH-CoQ réductase/NADH déshydrogénase d'*E. coli* (3RKO, 3,0 Å de résolution, 8,6 % d'identité de séquence avec *pf*ELOVL5) et de *Thermus thermophilus* (4HE8, 3,3 Å de résolution, 9,5 % d'identité de séquence avec *pf*ELOVL5) (Figure 4-10B) [81,82].

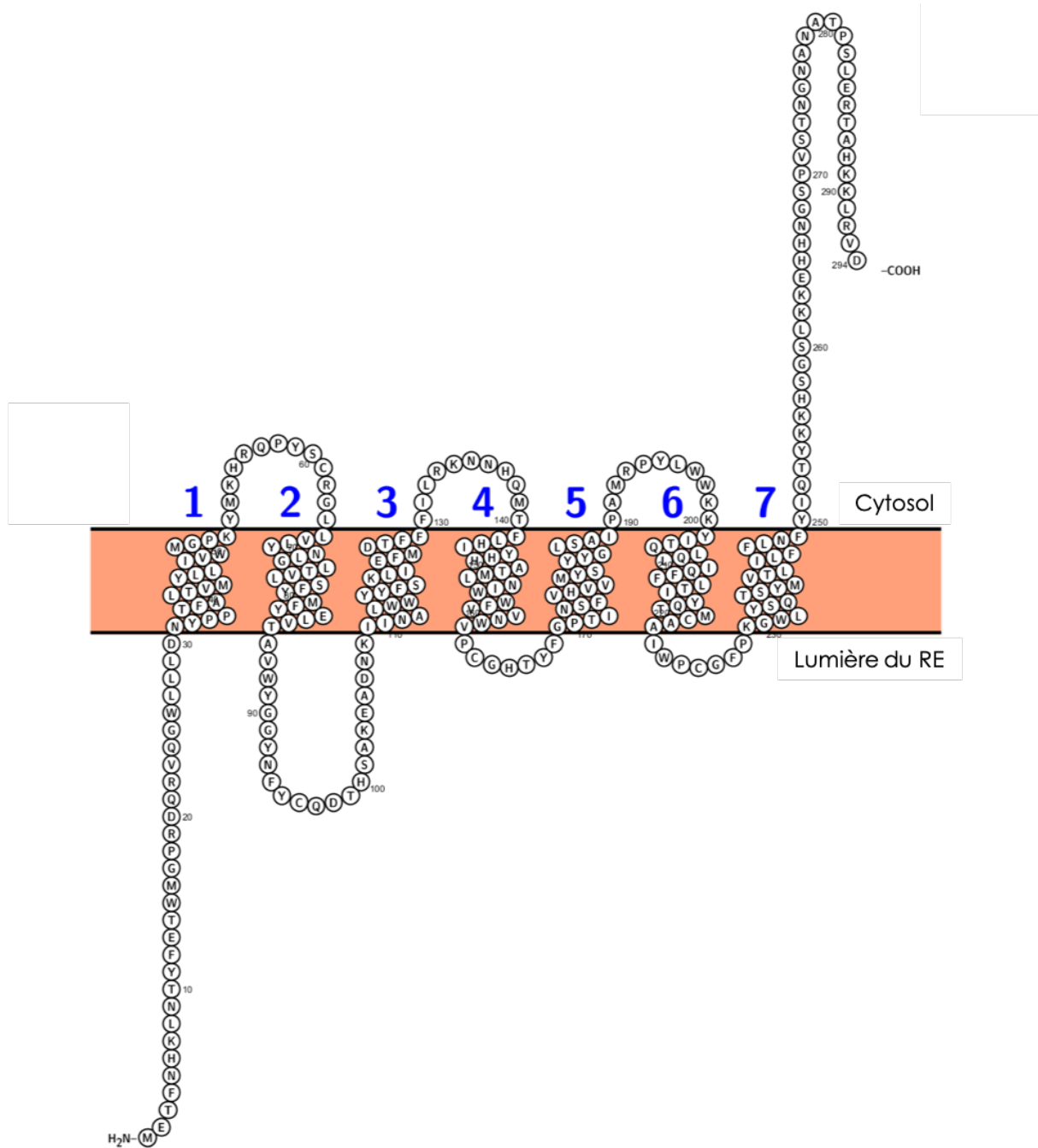


Figure 4-9. Modèle théorique 2D de pELOVL5 (<http://wlab.ethz.ch/protter/start/>).

- Concernant le premier groupe, la faible longueur du segment considéré (entre 2 et 16 % de la séquence totale) combinée à l'absence de parenté entre les *templates* et notre protéine nous conduisent à invalider ces modèles.
- En ce qui concerne le second groupe, on peut remarquer la présence de 7 hélices α transmembranaires dans une configuration permettant une insertion en membrane. Bien que la localisation des résidus conservés, réputés impliqués dans le site catalytique (boîtes KEDT, His, Tyr, Gln), ne soit pas optimale, et malgré la présence d'une huitième (courte) hélice – cependant localisée hors de la région membranaire –, nous avons utilisé ces modèles comme *templates* dans le cadre de la modélisation *de novo/ab initio*.

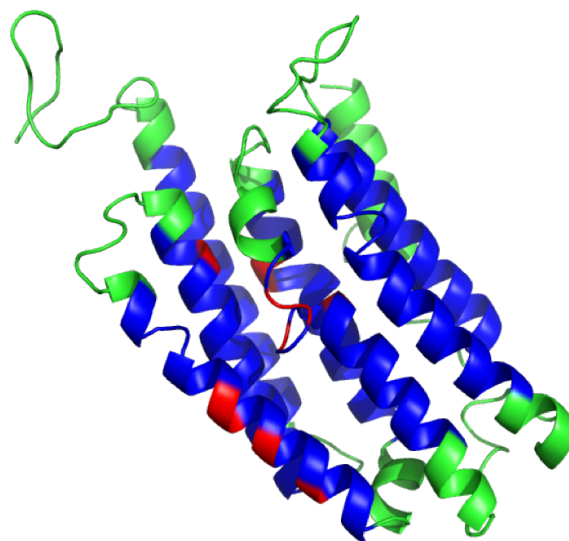
A**B**

Figure 4-10. Résultat de modélisation par reconnaissance de conformation pour *pfELOVL5*. **A** – Modélisation d'après 1Q90 (un cytochrome b₆f) ; **B** – Modélisation d'après 3RKO. Bleu, hélices α transmembranaires ; rouge, résidus conservés réputés impliqués dans le site catalytique.

Modélisation *de novo/ab initio*. De même que pour *pf* Δ 6D, deux séries de modèles ont été générées grâce au programme **Rosetta@home** : l'une sans *template*, l'autre avec le *template* dérivé de 3RKO (choisi en raison de sa meilleure résolution). De plus, quatre conditions de contraintes ont été utilisées (distance entre les 4 boîtes conservées) : 0, 5, 10 et 15 Å. Les modèles bruts générés ont ensuite été relaxés (Figure 4-11) et les plus favorables en termes énergétiques sélectionnés – il est à noter que, quelle que soit la modalité appliquée (*template* ou contrainte), celle-ci ne semble pas influencer leur résolution. Les diagrammes de Ramachandran réalisés par la suite viennent appuyer la qualité et la plausibilité des différents modèles générés (Figure 4-12). Dans la suite des analyses, il faudra néanmoins prêter attention aux différentes « faiblesses » possibles de nos prédictions :

- la localisation des résidus conservés et potentiellement impliqués dans le site actif (boîtes KEDT, His, Tyr, Gln) ;
- l'occupation de l'espace dédié à la membrane par des éléments solubles (notamment en raison de la localisation de TMH) ;
- la résolution des hélices α transmembranaires, notamment vis-à-vis d'un éventuel décalage dans leur localisation ou d'une orientation incorrecte par rapport à la membrane.

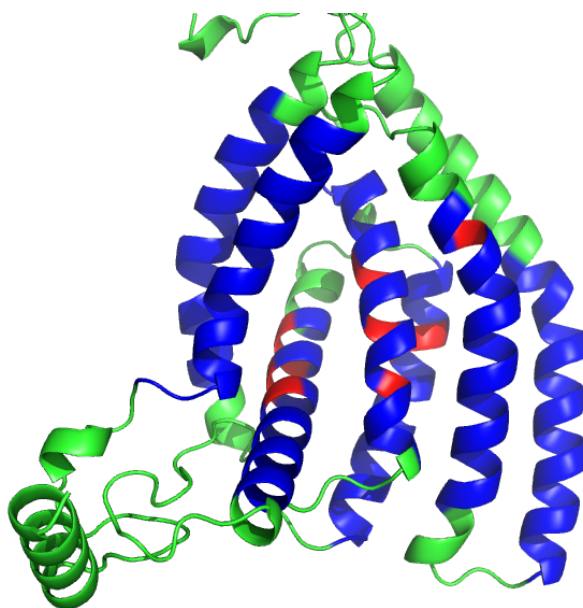


Figure 4-11. Modèle 3D de pfELOVL5 obtenu par Rosetta – Structure relaxée. Bleu, hélices α transmembranaires ; rouge, résidus conservés réputés impliqués dans le site catalytique.

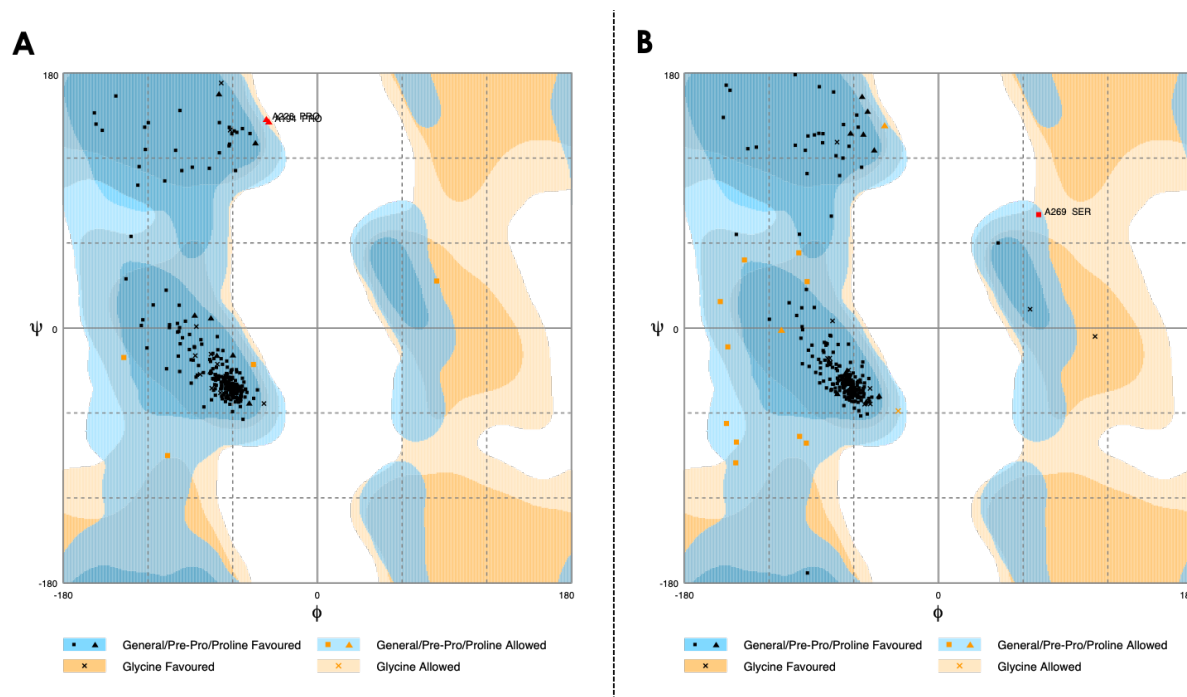


Figure 4-12. Diagramme de Ramachandran. **A** – Modèle d'ELOVL5 généré sans *template* ; **B** – Modèle d'ELOVL5 généré à partir du *template* 3RKO.

Dans la suite de ce travail, deux modèles ont été choisis, l'un provenant de la série « sans *template* + 5 Å de contrainte » (« ELOVL_SANS »), l'autre de la série « avec *template* + 0 Å de contrainte » (« ELOVL_3RKO »).

Insertion en membrane et dynamique moléculaire. ELOVL_SANS et ELOVL_3RKO ont ensuite été insérés dans une bicouche lipidique de SLPC (Figure 4-13). Ce phospholipide a été choisi car la phosphatidylcholine représente plus de 50 % du contenu lipidique du RE (base de données OMP³⁴). Par ailleurs, son groupement linoléyle (C18:2 Δ 9,12) est proche de l'acide γ -

³⁴ <http://opm.phar.umich.edu/atlas.php?membrane=Endoplasmic%20reticulum%20membrane>

linoléique (C18:3 Δ 6,9,12), un des substrats de ELOVL5 (18 carbones, plusieurs doubles liaisons). De plus, l'acide linoléique est un substrat direct de ELOVL5 dans la voie alternative « Δ 8D » [83-86].

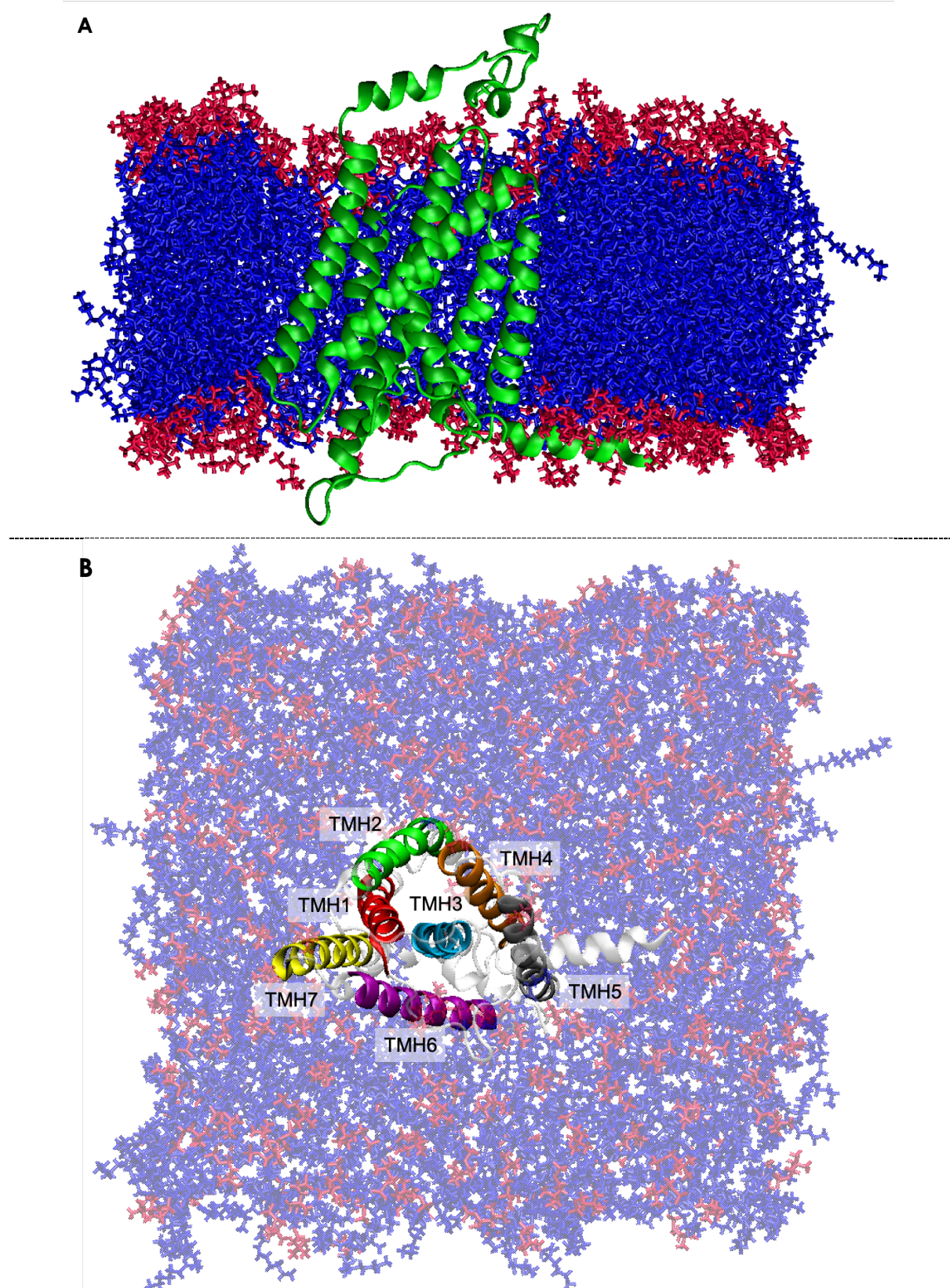


Figure 4-13. ELOVL5_3RKO dans une bichouche de SLPC. **A** – Vue latérale ; **B** – Vue du dessus.

Les simulations de dynamique moléculaire ont été réalisées sur une plage de 210 ns avec échantillonnage toutes les 10 secondes. En ce qui concerne le contenu en structures secondaires, chaque motif reste stable tout le long de la simulation, avec 60-70 % d'hélices α et aucun coude/pont/feuillet β . Ces résultats confirment et affinent notre prédiction initiale (conformation hélicoïdale). En outre, les différentes « faiblesses » relevées ont pu être « ajustées » grâce à l'insertion en membrane et à la MD. Par ailleurs, les diagrammes de RMSD et RMSF confirment la robustesse de nos modèles (Figure 4-14), avec respectivement moins de 1 et 0,5 Å (jusqu'à 2 Å aux extrémités) pour ELOVL_SANS et moins de 0,8 et 0,6 Å (jusqu'à 1,4 Å aux extrémités) pour ELOVL_3RKO.

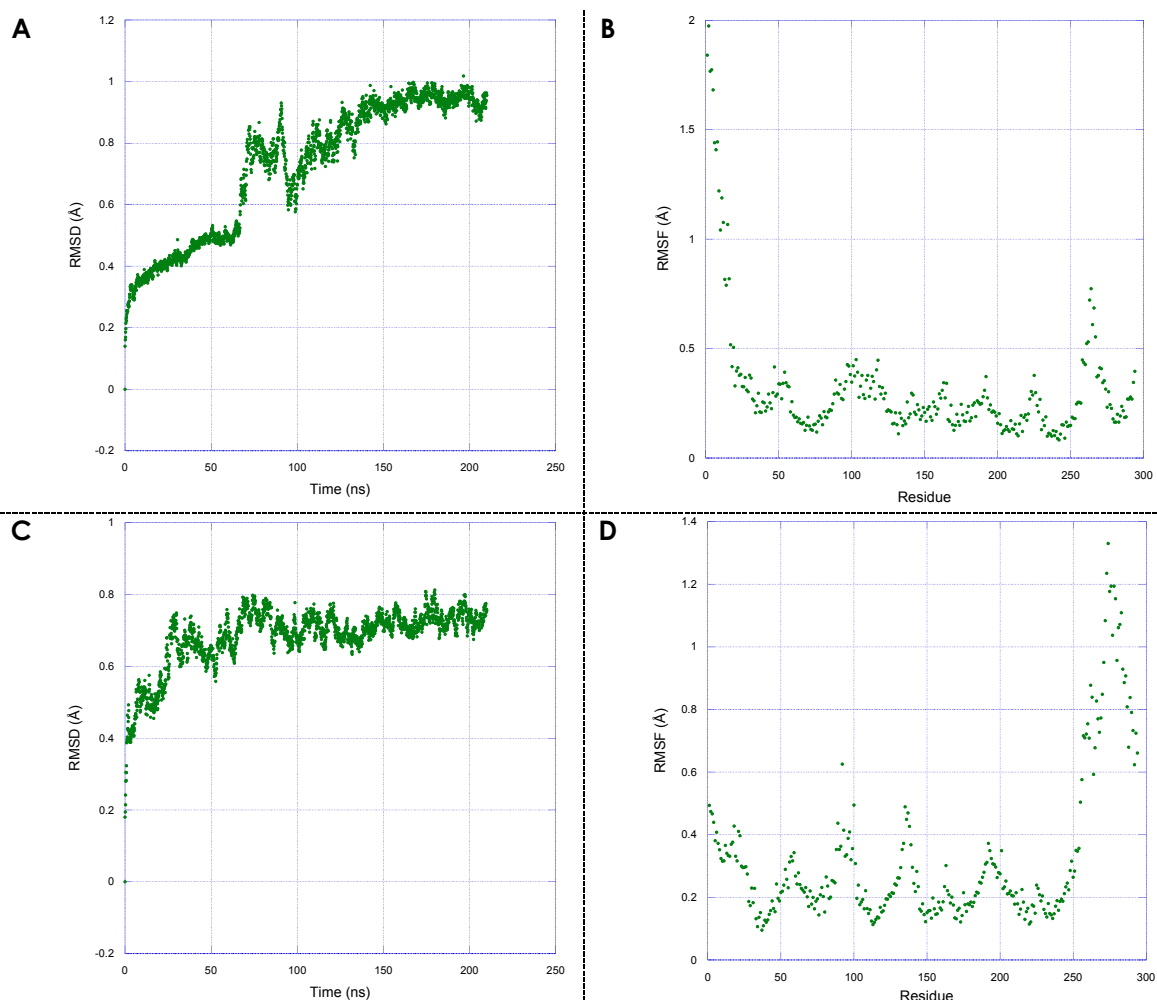


Figure 4-14. Diagrammes de RMSD/RMSF. **A** – RMSD d'ELOVL5_SANS ; **B** – RMSF d'ELOVL5_SANS ; **C** – RMSD d'ELOVL5_3RKO ; **D** – RMSF d'ELOVL5_3RKO.

3.2.4. Interactions enzyme-substrat

Les deux modèles sélectionnés ne pouvant être discriminés sur base de leur diagramme de Ramachandran, RMSD ou RMSF, les simulations d'interactions enzyme-substrat ont été réalisées à la fois sur ELOVL_SANS et ELOVL_3RKO.

L'absence d'une « poche catalytique » suffisamment grande chez ELOVL_SANS n'a pas permis de générer des propositions d'amarrage moléculaire entre l'enzyme et son substrat. Les modèles discutés porteront donc uniquement sur ELOVL_3RKO et ses deux substrats investigués (les acides γ -linolénique et arachidonique – voir à ce sujet la Figure 1-9).

Tableau 4-6. Distances (en Å) enzyme-substrat en fonction du mode de liaison et de l'acide aminé impliqué.

Mode	Itération	Score	W ¹¹⁴	Y ¹¹⁷	K ¹²⁰	H ¹⁷⁷	Q ²⁰⁹
π W	1	68,04	1,3		1,3	1,0	
	2	59,85	1,9		1,5	3,3	
	3	62,17	1,6		1,5	1,6	
	4	61,10	2,0		2,1	1,3	
	5	58,24	1,9		1,8	1,1	
HBO	6	65,65		2,0	1,6		2,7
	7	63,75		2,0	1,6		2,8
	8	58,58		2,4	1,8		3,0
	9	58,67		1,9	1,7		4,1
Type de liaison			CH- π	Pont H	Pont H	Pont H	Pont H
Site catalytique			/	X	X	X	X
Motif conservé			/	/	KEDT	Tyr	Gln
Résolution de conservation			/	/	Absol ^t	Absol ^t	Hautem ^t

Deux modes de liaisons de l'acide γ -linoléique ont pu être identifiés : « π W » et « HBO » (Tableau 4-6).

- Dans le mode π W, deux types d'interactions moléculaires sont impliquées : une liaison hydrogène³⁵ entre le carboxylate du ligand et la fonction polaire des résidus K¹²⁰ et H¹⁷⁷ (H...N), et une interaction CH- π ³⁶ entre la chaîne alkyle du ligand et le groupement indole du résidu W¹¹⁴ (Figure 4-15A).
- Dans le mode HBO, seules sont impliquées des liaisons hydrogène entre le carboxylate du ligand et les fonctions polaires des résidus Y¹¹⁷ et Q²⁰⁹ (respectivement H...O et H...N) (Figure 4-15B).

Dans le cas de l'acide arachidonique, seul le mode HBO a été observé, impliquant deux liaisons hydrogène entre le carboxylate du ligand et les fonctions polaires des résidus Y¹¹⁷ et H¹⁷⁷ (respectivement H...O et H...N).

Les quatre liaisons hydrogène identifiées se répartissent entre liaisons :

- très fortes (entre 1,2 et 1,5 Å) : H¹⁷⁷-ligand (1,3-1,6 Å) ;
- fortes (entre 1,5 et 2,2 Å) : Y¹¹⁷-ligand et K¹²⁰-ligand (respectivement 2,1 et 1,7 Å) ;
- faibles (2,2 et 3,0 Å) : Q²⁰⁹-ligand (3,2 Å) [87].

L'interaction CH- π (1,7 Å) se trouve quant à elle dans la gamme de distance décrite dans la littérature (< 3,05 Å) [88]. Par ailleurs, dans un mode comme dans l'autre, la chaîne alkyle du ligand se localise à proximité de résidus hydrophobes ou aromatiques :

- L²⁸, W²⁶, L¹¹³, Y¹¹⁷, V¹⁷⁶ et L²¹² pour π W ;
- L²⁸, A¹⁰⁵, I¹¹⁰, L¹¹³, W¹¹⁴ et V¹⁷⁶ pour HBO.

Certains résidus impliqués dans ces interactions moléculaires font partie des motifs conservés d'ELOVL (K¹²⁰ dans la boîte KEDT, H¹⁷⁷ dans la boîte Tyr et Q²⁰⁹ dans la boîte Gln). Parmi eux, K¹²⁰ et H¹⁷⁷ sont absolument conservés parmi les élongases d'acides gras et Q²⁰⁹ hautement conservé. Seul W¹¹⁴ semble ne pas faire partie du site catalytique [74].

³⁵ Interaction de type électrostatique très fréquemment rencontrée au sein des macromolécules biologiques.

³⁶ Configuration « *edge-to-face* » des interactions de type π - π .

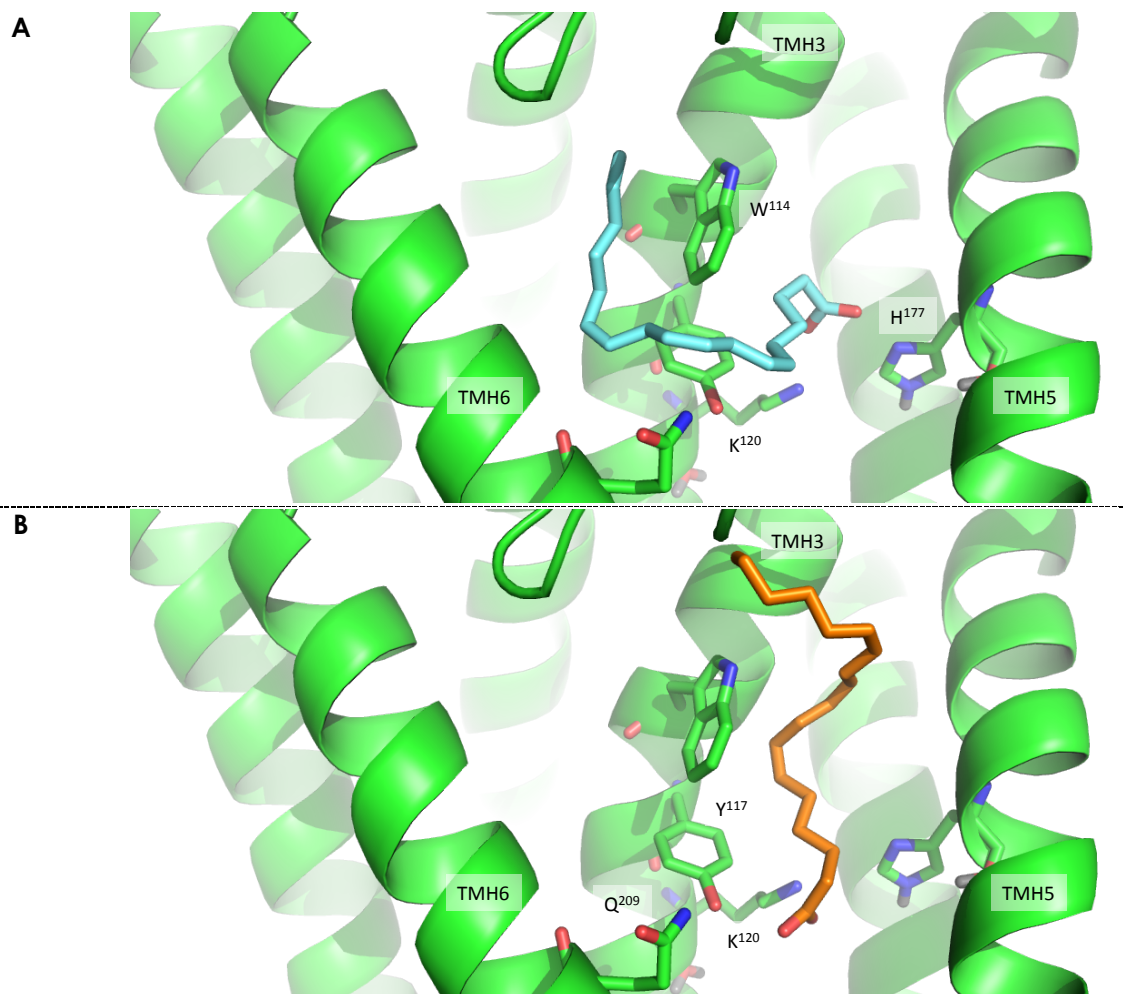


Figure 4-15. Résultat de l'amarrage moléculaire de l'acide γ -linolénique sur ELOVL5_3RKO.
A – Mode πW ; **B** – Mode HBO.

4. Réalisations à l'issue de ce chapitre

Par cette approche théorique, nous avons réussi d'une part, par la méthode *de novo/ab initio*, à modéliser *pfELOVL5*, l'une des deux enzymes du métabolisme des acides gras longs chez *P. fluviatilis*. D'autre part, grâce à la technique de l'amarrage moléculaire, nous avons pu proposer deux modes de liaison de cette enzyme à deux de ses substrats, les acides γ -linolénique et arachidonique.

Étant donné les limites techniques de **Rosetta@home** concernant les gros systèmes, il ne nous a cependant pas été possible de proposer un modèle théorique pour *pf* $\Delta 6D$.

5. Bibliographie

- [1] E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M.R. Wilkins, R.D. Appel, A. Bairoch, Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server, in: J.M. Walker (Ed.), Proteomics Protoc. Handb., Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2005: pp. 571–607.
- [2] P. Rice, I. Longden, A. Bleasby, EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Trends Genet. 16 (2000) 276–277.

- [3] J.C. Obenauer, L.C. Cantley, M.B. Yaffe, Scansite 2.0: proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 3635–3641.
- [4] W. Kabsch, C. Sander, Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features, *Biopolymers* 22 (1983) 2577–2637.
- [5] R.B. Russell, Classification of Protein Folds, in: D.M. Webster (Ed.), *Protein Struct. Predict. Methods Protoc.*, Humana Press Inc., Totowa, 2000: pp. 305–324.
- [6] K.-C. Chou, Y.-D. Cai, Predicting protein structural class by functional domain composition, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 321 (2004) 1007–1009. doi:10.1016/j.bbrc.2004.07.059.
- [7] C. Combet, C. Blanchet, C. Geourjon, G. Deléage, NPS@: Network Protein Sequence Analysis, *TIBS* 25 (2000) 147–150.
- [8] S. Hirose, T. Noguchi, ESPRESSO : A system for estimating protein expression and solubility in protein expression systems, *Proteomics* 13 (2013) 1444–1456.
- [9] J. Cheng, A. Randall, M. Sweredoski, P. Baldi, SCRATCH : a protein structure and structural feature prediction server, *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) 72–76.
- [10] T. Goldberg, M. Hecht, T. Hamp, T. Karl, G. Yachdav, N. Ahmed, U. Altermann, P. Angerer, S. Ansorge, K. Balasz, M. Bernhofer, A. Betz, L. Cizmadija, K.T. Do, J. Gerke, R. Greil, V. Joerdens, M. Hastreiter, K. Hembach, M. Herzog, M. Kalemanov, M. Kluge, A. Meier, H. Nasir, U. Neumaier, V. Prade, J. Reeb, A. Sorokoumov, I. Troshani, S. Vorberg, S. Waldruff, J. Zierer, H. Nielsen, B. Rost, LocTree3 prediction of localization, *Nucleic Acids Res.* 42 (2014) 350–355.
- [11] T. Goldberg, T. Hamp, B. Rost, LocTree2 predicts localization for all domains of life, *Bioinformatics* 28 (2012) 458–465.
- [12] K.-C. Chou, Z.-C. Wu, X. Xiao, iLoc-Euk: A multi-label classifier for predicting the subcellular localization of singleplex and multiplex eukaryotic proteins, *PLoS One* 6 (2011) 1–10.
- [13] K. Nakai, P. Horton, PSORT: A program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization, *Trends Biochem. Sci.* 24 (1999) 34–35.
- [14] K. Hiller, A. Grote, M. Scheer, R. Münch, D. Jahn, PrediSi: prediction of signal peptides and their cleavage positions, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) 375–379.
- [15] O. Emanuelsson, H. Nielsen, S. Brunak, G. von Heijne, Predicting Subcellular Localization of Proteins Based on their N-terminal Amino Acid Sequence, *J. Mol. Biol.* 300 (2000) 1005–1016.
- [16] H. Nielsen, J. Engelbrecht, S. Brunak, G. von Heijne, Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites, *Protein Eng.* 10 (1997) 1–6.
- [17] T.N. Petersen, S. Brunak, G. von Heijne, H. Nielsen, SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions, *Nat. Methods.* 8 (2011) 785–786.
- [18] P.G. Bagos, T.D. Liakopoulos, I.C. Spyropoulos, S.J. Hamodrakas, PRED-TMBB: A web server for predicting the topology of beta-barrel outer membrane proteins, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) 400–404.
- [19] F.S. Berven, K. Flikka, H.B. Jensen, I. Eidhammer, BOMP: a program to predict integral β -barrel outer membrane proteins encoded within genomes of Gram-negative bacteria, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) 394–399.
- [20] M. Cserző, E. Wallin, I. Simon, G. von Heijne, A. Elofsson, Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method, *Protein Eng.* 10 (1997) 673–676.
- [21] K. Hofmann, W. Stoffel, A Database of Membrane Spanning Protein Segments, *Biol. Chem.* 374 (1993) 166.
- [22] G.E. Tusnády, I. Simon, The HMMTOP transmembrane topology prediction server, *Bioinformatics* 17 (2001) 849–850.
- [23] H. Viklund, A. Elofsson, OCTOPUS: improving topology prediction by two-track ANN-based preference scores and an extended topological grammar, *Bioinformatics* 24 (2008) 1662–1668.

- [24] S.M. Reynolds, L. Käll, M.E. Riffle, J.A. Bilmes, W.S. Noble, Transmembrane topology and signal peptide prediction using dynamic Bayesian networks, *PLoS Comput. Biol.* 4 (2008) 1–14.
- [25] L. Käll, A. Krogh, E.L. Sonnhammer, A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method, *J. Mol. Biol.* 338 (2004) 1027–1036.
- [26] C. Peters, K.D. Tsirigos, N. Shu, A. Elofsson, Improved topology prediction using the terminal hydrophobic helices rule, *Bioinformatics* 32 (2016) 1158–1162.
- [27] T. Hirokawa, S. Boon-Chieng, S. Mitaku, SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins, *Bioinformatics* 14 (1998) 378–379.
- [28] D. Juretić, L. Zoranić, D. Zucić, Basic charge clusters and predictions of membrane protein topology, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 42 (2002) 620–632.
- [29] H. Viklund, A. Bernsel, M. Skwark, A. Elofsson, SPOCTOPUS: a combined predictor of signal peptides and membrane protein topology, *Bioinformatics* 24 (2008) 2928–2929.
- [30] C.M. Deber, C. Wang, L.-P. Liu, A.S. Prior, S. Agrawal, B.L. Muskat, A.J. Cuticchia, TM Finder: A prediction program for transmembrane protein segments using a combination of hydrophobicity and nonpolar phase helicity scales, *Protein Sci.* 10 (2001) 212–219.
- [31] A. Krogh, B. Larsson, G. von Heijne, E.L. Sonnhammer, Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes, *J. Mol. Biol.* 305 (2001) 567–580.
- [32] G. Von Heijne, Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule, *J. Mol. Biol.* 225 (1992) 487–494.
- [33] T. Schwede, A. Sali, N. Eswar, M.C. Peitsch, Protein Structure Modeling, in: T. Schwede, M.C. Peitsch (Eds.), *Comput. Struct. Biol. - Methods Appl.*, 1st editio, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapore, 2008: pp. 3–35.
- [34] A. Roy, Y. Zhang, Protein Structure Prediction, *ELS* (2012) 1–11.
- [35] Y. Zhang, Progress and challenges in protein structure prediction, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18 (2008) 342–348.
- [36] J.U. Bowie, R. Lüthy, D. Eisenberg, A Method to Identify Protein Sequences That Fold into a Known Three-Dimensional Structure, *Science* 253 (1991) 164–170.
- [37] Y. Zhang, J. Skolnick, The protein structure prediction problem could be solved using the current PDB library, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102 (2005) 1029–1034.
- [38] D.S. Marks, L.J. Colwell, R. Sheridan, T.A. Hopf, A. Pagnani, R. Zecchina, C. Sander, Protein 3D Structure Computed from Evolutionary Sequence Variation, *PLoS One* 6 (2011) 1–20.
- [39] T. Flock, A. Venkatakrishnan, K. Vinothkumar, M.M. Babu, Deciphering membrane protein structures from protein sequences, *Genome Biol.* 13 (2012) 1–4.
- [40] D.J. Osguthorpe, Ab initio protein folding, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10 (2000) 146–152.
- [41] M. Punta, P. Coggill, R.Y. Eberhardt, J. Mistry, J. Tate, C. Boursnell, N. Pang, K. Forslund, G. Ceric, J. Clements, A. Heger, L. Holm, E.L.L. Sonnhammer, S.R. Eddy, A. Bateman, R.D. Finn, The Pfam protein families database, *Nucleic Acids Res.* 40 (2012) 290–301.
- [42] R.D. Finn, J. Mistry, J. Tate, P. Coggill, A. Heger, J.E. Pollington, O.L. Gavin, P. Gunasekaran, G. Ceric, K. Forslund, L. Holm, E.L.L. Sonnhammer, S.R. Eddy, A. Bateman, The Pfam protein families database, *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) 211–222.
- [43] C. Lambert, N. Léonard, X. De Bolle, E. Depiereux, ESyPred3D: Prediction of proteins 3D structures, *Bioinformatics* 18 (2002) 1250–1256.
- [44] L.A. Kelley, S. Mezulis, C.M. Yates, M.N. Wass, M.J. Sternberg, The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis, *Nat. Protoc.* 10 (2015) 845–858.
- [45] M. Källberg, H. Wang, S. Wang, J. Peng, Z. Wang, H. Lu, J. Xu, Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server, *Nat. Protoc.* 7 (2012) 1511–1522.

- [46] R. Das, D. Baker, Macromolecular Modeling with Rosetta, *Annu. Rev. Biochem.* 77 (2008) 363–382.
- [47] K.W. Kaufmann, G.H. Lemmon, S.L. Deluca, J.H. Sheehan, J. Meiler, Practically useful: what the Rosetta protein modeling suite can do for you, *Biochemistry* 49 (2010) 2987–2998.
- [48] S.C. Lovell, I.W. Davis, W.B.I. Arendall, P.I. de Bakker, J.M. Word, M.G. Prisant, J.S. Richardson, D.C. Richardson, Structure Validation by C-alpha Geometry: phi, psi and C-beta Deviation, *Proteins Struct. Funct. Genet.* 50 (2003) 437–450.
- [49] S. Jo, T. Kim, V.G. Iyer, W. Im, CHARMM-GUI: A Web-Based Graphical User Interface for CHARMM, *J. Comput. Chem.* 29 (2008) 1859–1865.
- [50] M.J. Abraham, T. Murtola, R. Schulz, S. Páll, J.C. Smith, B. Hess, E. Lindahl, GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers, *SoftwareX* 1–2 (2015) 19–25.
- [51] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, VMD: Visual Molecular Dynamics, *J. Mol. Graph.* 14 (1996) 33–38.
- [52] D. Chivian, D.E. Kim, L. Malmstro, J. Schonbrun, C.A. Rohl, D. Baker, Prediction of CASP6 Structures Using Automated Robetta Protocols, *Proteins Struct. Funct. Genet. Suppl.* 7 (2005) 157–166.
- [53] G. Jones, P. Willett, R.C. Glen, A.R. Leach, R. Taylor, Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking, *J. Mol. Biol.* 267 (1997) 727–748.
- [54] M. Vagner, E. Santigosa, Characterization and modulation of gene expression and enzymatic activity of delta-6 desaturase in teleosts: A review, *Aquaculture* 315 (2011) 131–143.
- [55] S.L. Pereira, A.E. Leonard, P. Mukerji, Recent advances in the study of fatty acid desaturases from animals and lower eukaryotes, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 68 (2003) 97–106.
- [56] D. López Alonso, F. García-Maroto, J. Rodríguez-Ruiz, J. a. Garrido, M. a. Vilches, Evolution of the membrane-bound fatty acid desaturases, *Biochem. Syst. Ecol.* 31 (2003) 1111–1124.
- [57] J. Shanklin, E. Whittle, B.G. Fox, Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearoyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase, *Biochemistry* 33 (1994) 12787–12794.
- [58] J.E. Stuckey, V.M. McDonough, C.E. Martin, The OLE1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the delta-9 fatty acid desaturase and can be functionally replaced by the rat stearoyl-CoA desaturase gene, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 20144–20149.
- [59] P. Sperling, P. Ternes, T.K. Zank, E. Heinz, The evolution of desaturases., *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 68 (2003) 73–95.
- [60] J. Shanklin, E.B. Cahoon, Desaturation and Related Modifications of Fatty Acids, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49 (1998) 611–641.
- [61] D. Meesapyodsuk, X. Qiu, Structure determinants for the substrate specificity of Acyl-CoA $\Delta 9$ desaturases from a marine copepod, *ACS Chem. Biol.* 9 (2014) 922–934.
- [62] W.C. Man, M. Miyazaki, K. Chu, J.M. Ntambi, Membrane topology of mouse stearoyl-CoA desaturase 1, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 1251–1260.
- [63] E. Schleiff, J. Soll, Membrane protein insertion: mixing eukaryotic and prokaryotic concepts, *EMBO Rep.* 6 (2005) 1023–1027.
- [64] J. Kyte, R.F. Doolittle, A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, *J. Mol. Biol.* 157 (1982) 105–132.
- [65] M.R. Prasad, K. Sreekrishna, V.C. Joshis, Topology of the Delta-9 Terminal Desaturase in Chicken Liver Microsomes and Artificial Micelles, *J. Biol. Chem.* 255 (1980) 2583–2589.
- [66] J.W. DePierre, L. Ernster, Enzyme topology of intracellular membranes, *Annu. Rev. Biochem.* 46 (1977) 201–262.
- [67] Y. Bai, J.G. McCoy, E.J. Levin, P. Sobrado, K.R. Rajashankar, B.G. Fox, M. Zhou, X-ray structure of a mammalian stearoyl-CoA desaturase, *Nature* 524 (2015) 252–256.

- [68] H. Wang, M.G. Klein, H. Zou, W. Lane, G. Snell, I. Levin, K. Li, B.-C. Sang, Crystal structure of human stearoyl-coenzyme A desaturase in complex with substrate, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22 (2015) 581–585.
- [69] M. Negrier, S.G. Kruglik, J.-C. Lambry, M.H. Vos, J.-L. Martin, S. Franzen, Role of heme iron coordination and protein structure in the dynamics and geminate rebinding of nitric oxide to the H93G myoglobin mutant: Implications for nitric oxide sensors, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 10389–10398.
- [70] A. Nimmermark, L. Öhrström, J. Reedijk, Metal-ligand bond lengths and strengths: are they correlated? A detailed CSD analysis, *Zeitschrift Für Krist.* 228 (2013) 311–317.
- [71] M.K. Agaba, D.R. Tocher, X. Zheng, C. a Dickson, J.R. Dick, A.J. Teale, Cloning and functional characterisation of polyunsaturated fatty acid elongases of marine and freshwater teleost fish, *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 142 (2005) 342–352.
- [72] P. Tvrdik, R. Westerberg, S. Silve, A. Asadi, A. Jakobsson, B. Cannon, G. Loison, A. Jacobsson, Role of a new mammalian gene family in the biosynthesis of very long chain fatty acids and sphingolipids, *J. Cell Biol.* 149 (2000) 707–717.
- [73] A. Jakobsson, R. Westerberg, A. Jacobsson, Fatty acid elongases in mammals: Their regulation and roles in metabolism, *Prog. Lipid Res.* 45 (2006) 237–249.
- [74] G. Carmona-Antoñanzas, D.R. Tocher, J.B. Taggart, M.J. Leaver, An evolutionary perspective on Elovl5 fatty acid elongase: comparison of Northern pike and duplicated paralogs from Atlantic salmon, *BMC Evol. Biol.* 13 (2013) 85–97.
- [75] A.E. Leonard, S.L. Pereira, H. Sprecher, Y.-S. Huang, Elongation of long-chain fatty acids, *Prog. Lipid Res.* 43 (2004) 36–54.
- [76] M. Monné, G. Gafvelin, R. Nilsson, G. von Heijne, N-tail translocation in a eukaryotic polytopic membrane protein. Synergy between neighboring transmembrane segments, *Eur. J. Biochem.* 263 (1999) 264–269.
- [77] M. Monné, T. Hessa, L. Thissen, G. Von Heijne, Competition between neighboring topogenic signals during membrane protein insertion into the ER, *FEBS J.* 272 (2005) 28–36.
- [78] D.A. Toke, C.E. Martin, Isolation and Characterization of a Gene Affecting Fatty Acid Elongation in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 18413–18422.
- [79] C.-S. Oh, D.A. Toke, S. Mandala, C.E. Martin, ELO2 and ELO3, homologues of the *Saccharomyces cerevisiae* ELO1 gene, function in fatty acid elongation and are required for sphingolipid formation, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 17376–17384.
- [80] A.D. Uttaro, Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in lower eukaryotes, *IUBMB Life* 58 (2006) 563–571.
- [81] R. Baradaran, J.M. Berrisford, G.S. Minhas, L. a Sazanov, Crystal structure of the entire respiratory complex I, *Nature* 494 (2013) 443–448.
- [82] R.G. Efremov, L.A. Sazanov, Structure of the membrane domain of respiratory complex I, *Nature* 476 (2011) 414–420.
- [83] J. Fonseca-Madrigal, J.C. Navarro, F. Hontoria, D.R. Tocher, C. a. Martinez-Palacios, O. Monroig, Diversification of substrate specificities in teleostei Fads2: characterization of D4 and D6D5 desaturases of *Chirostoma estor*, *J. Lipid Res.* 55 (2014) 1408–1419.
- [84] Ó. Monroig, D.R. Tocher, F. Hontoria, J.C. Navarro, Functional characterisation of a Fads2 fatty acyl desaturase with $\Delta 6/\Delta 8$ activity and an Elovl5 with C16, C18 and C20 elongase activity in the anadromous teleost meagre (*Argyrosomus regius*), *Aquaculture* 412–413 (2013) 14–22.
- [85] O. Monroig, Y. Li, D.R. Tocher, Delta-8 desaturation activity varies among fatty acyl desaturases of teleost fish: high activity in delta-6 desaturases of marine species, *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 159 (2011) 206–213.
- [86] W.-C. Tu, R.J. Cook-Johnson, M.J. James, B.S. Mühlhäusler, D. a J. Stone, R. a Gibson, Barramundi (*Lates calcarifer*) desaturase with $\Delta 6/\Delta 8$ dual activities, *Biotechnol. Lett.* 34 (2012) 1283–1296.
- [87] T. Steiner, The Hydrogen Bond in the Solid State, *Angew. Chemie Int. Ed.* 41 (2002) 48–76.

- [88] O. Takahashi, Y. Kohno, M. Nishio, Relevance of Weak Hydrogen Bonds in the Conformation of Organic Compounds and Bioconjugates: Evidence from Recent Experimental Data and High-Level ab Initio MO Calculations, Chem. Rev. 110 (2010) 6049–6076.

6. Programmes utilisés

- Banques de données
 - Protéines membranaires : PDBTM – Institute of Enzymology, Hongrie (<http://pdbtm.enzim.hu/>)
 - Orientation des protéines en membrane : OMP – Lomize Group, University of Michigan, USA (<http://opm.phar.umich.edu/>)
- Traduction : ExPASy Translate tool – Swiss Institute of Bioinformatics, Suisse (<http://web.expasy.org/translate/>)
- Poids moléculaire et pI
 - ExPASy Compute pI/MW tool (http://web.expasy.org/compute_pi/)
 - ExPASy ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>)
 - Peptide Property Calculator – Center for Biotechnology, Northwestern University, USA (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/proteincalc.html>)
 - Scansite 3 – MIT (<http://scansite3.mit.edu/#util-calcMwAndPi>)
 - EMBOSS Pepstats tool – European Bioinformatics Institute – European Molecular Biology Laboratory, Royaume-Uni (https://www.ebi.ac.uk/Tools/seqstats/emboss_pepstats/)
- Structure secondaire : NPS@ secondary structure prediction tool – IBCP, Université Lyon I-Claude Bernard, France (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_secons.html)
- Solubilité
 - ESPRESSO – Computational Biology Research Consortium, Japon (<http://mbs.cbrc.jp/ESPRESSO/Submission.php>)
 - SPpred – Bioinformatics Centre, Institute of Microbial Technology, Inde (<http://crdd.osdd.net:8081/sppred/submit.jsp>)
 - SCRATCH SOLpro tool – ICS, University of California at Irvine, USA (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu>)
- TMH protéine : SRATCH ABTMpro tool – ICS, University of California at Irvine, USA (<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu>)
- Tonneaux beta
 - PRED-TM $\beta\beta$ – Biophysics & Bioinformatics Laboratory, University of Athens (<http://bioinformatics.biol.uoa.gr/PRED-TMBB/index.jsp>)
 - BOMP – Computational Biology Unit, University of Bergen (<http://services.cbu.uib.no/tools/bomp>)
- Profils d'hydropathie
 - DAS – IMP Bioinformatics Group, Research Institute of Molecular Pathology, Autriche (<http://mendel.imp.ac.at/sat/DAS>)
 - HMMTOP – Institute of Enzymology, Hungarian Academy of Sciences, Hungary (<http://www.enzim.hu/hmmtop/html/submit.html>)
 - Phobius – Stockholm Bioinformatics Center, Stockholm University, Sweden (<http://phobius.sbc.su.se>)
 - SOSUI – Nagahama Institute of Bio-Science and Technology, Japan (http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/sosui_submit.html)
 - OCTOPUS – Stockholm Bioinformatics Center, Stockholm University, Sweden (<http://octopus.cbr.su.se/index.php>)
 - TM-Finder – SickKids, Toronto University, Canada (<http://tmfinder.research.sickkids.ca/cgi-bin/TMFinderForm.cgi>)
 - TMHMM – Center for Biological Sequence Analysis, Technical University of Denmark, Denmark (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)
 - ExPASy TMPred tool (http://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html)
 - TopPred – BITC, Institut Pasteur & RPBS, Université Paris VII-Diderot, France (<http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms:toppred>)
 - SPLIT 4.0 – Biophysics Laboratory, University of Split, Croatie (<http://split.pmfst.hr/split/4/>)

- TOPCONS – The Arrhenius Laboratories for Natural Sciences, Stockholm University, Suède (<http://topcons.cbr.su.se/pred/>)
 - PHDhtm – NPS@ (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_htm.html)
 - Philius – Yeast Resource Center, University of Washington (<http://www.yeastrc.org/philius/pages/philius/runPhilius.jsp;jsessionid=EF8989D84441C40AE2E0DC97B3E9A2A6>)
 - PolyPhobius – Stockholm Bioinformatics Center (<http://phobius.sbc.su.se/poly.html>)
 - SPOCTOPUS – Stockholm Bioinformatics Center (<http://octopus.cbr.su.se/index.php>)
 - SCAMPI – Stockholm Bioinformatics Center (<http://scampi.cbr.su.se>)
 - TOPCONS : Octopus, Philius, Polyphobius, SCAMPI, Spoctopus
- Peptide signal
 - PrediSi – Institute for Microbiology, Technical University of Braunschweig, Allemagne (<http://www.predisi.de/index.html>)
 - TargetP 1.1 – Center for Biological Sequence Analysis, Technical University of Denmark, Denmark (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>)
 - PSORT – Laboratory of Functional Analysis *in silico*, University of Tokyo, Japan (<http://psort.hgc.jp/form.html>)
 - SignalP 4.1 – Center for Biological Sequence Analysis, Technical University of Denmark, Denmark (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)
- Localisation
 - LocTree3 – RostLab, Technische Universität München, Allemagne (<https://rostlab.org/services/loctree3/>)
 - iLoc – JCI BioInfo Lab, Jingdezhen Ceramic Institute, Chine (<http://www.jci-bioinfo.cn/iLoc-Animal>)
 - ProtComp 9.0 – Softberry Inc., USA (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=protcompan&group=programs&subgroup=proloc>)
 - PSORT – Laboratory of Functional Analysis *in silico*, University of Tokyo, Japan (<http://psort.hgc.jp/form.html>)
- Modèle 2D
 - Protter – Wollscheid Group, ETH Zürich, Suisse (<http://wlab.ethz.ch/protter/start/>)
- Famille de protéines
 - Pfam – European Molecular Biology Laboratory, European Bioinformatics Institute, Royaume-Uni (<http://pfam.xfam.org>)
- Homologie et 3D-1D
 - ESYPred3D 1.0 – Unité de Recherche en Biologie des Microorganismes, Université de Namur, Belgique (<http://www.unamur.be/sciences/biologie/urbm/bioinfo/esypred/>)
 - RaptorX – Computational Institute, University of Chicago, USA (<http://raptorx.uchicago.edu>)
 - Phyre 2 – Structural Bioinformatics Group, Imperial College London, Royaume-Uni (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>)
- Rosetta
 - Robetta – Bakerlab, University of Washington, USA (<http://robeta.bakerlab.org>)
 - Rosetta@home – Bakerlab, University of Washington, USA (<https://www.rosettacommons.org>)
- Dynamique moléculaire
 - CHARMM-GUI – Wonpillab, Lehigh University, USA (<http://www.charmm-gui.org/>)
 - GROMACS – Science For Life Laboratory, Stockholm University and KTH & Uppsala Biomedical Centre, Suède (<http://www.gromacs.org/>)
 - RAMPAGE – Crystallography and Bioinformatics Group, University of Cambridge, Royaume-Uni (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>)
 - KaleidaGraph – Synergy Software Inc., USA (http://www.synergy.com/wordpress_650164087/kaleidagraph/)
- Amarrage moléculaire
 - GOLD – Cambridge Crystallographic Data Centre, University of Cambridge, Royaume-Uni (<http://www.ccdc.cam.ac.uk/Solutions/GoldSuite/Pages/GOLD.aspx>)
- Visualisation
 - MacPyMOL – Schrödinger, Inc., USA (<https://www.pymol.org>)
 - VMD – Theoretical and Computational Biophysics Group, University of Illinois at Urbana-Champaign, USA (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>)

CHAPITRE 5

Chapitre 5 – Conclusions et mise en perspective

1. ENZYMES DU METABOLISME LIPIDIQUE DE <i>P. FLUVIATILIS</i> – CONTEXTE ET OBJECTIF.....	81
2. <i>pf</i> Δ 6D, UNE DESATURASE DE TYPE FED	81
3. <i>pf</i> ELOVL5, UNE ELONGASE DE TYPE ELOVL	82
4. DEVELOPPEMENTS POSSIBLES.....	82

1. Enzymes du métabolisme lipidique de *P. fluviatilis* – Contexte et objectif

Cette étude s'est inscrite dans la problématique générale de l'approvisionnement des populations humaines en ressources alimentaires et plus spécifiquement du développement de l'aquaculture comme alternative à la pêche. Dans ce cadre, la perche commune (*Perca fluviatilis* Linnaeus, 1758) a été utilisée comme espèce modèle du métabolisme des acides gras longs polyinsaturés (HUFA), cette dernière se révélant capable de synthétiser ces lipides d'intérêt nutritif pour l'homme à partir de leurs précurseurs végétaux (PUFA). Dans ce contexte, l'objectif général de ce travail était la caractérisation structurale d'une désaturase de type FED et d'une élongase de type ELOVL, enzymes clés de la voie de synthèse des HUFA chez les eucaryotes, dans le but de déterminer les fondamentaux moléculaires sous-tendant ce processus biochimique chez les poissons et de proposer les premiers modèles structuraux et mécanistiques de ces deux familles d'enzymes chez les animaux. La stratégie mise en place a reposé sur la combinaison de méthodes expérimentales et théoriques, utilisées de manière successive pour chacune des enzymes caractérisées.

2. *pf* Δ 6D, une désaturase de type FED

A partir de matériel biologique frais, nous avons d'abord isolé la séquence nucléotidique d'une désaturase de type « front-end » pour ensuite identifier sa séquence peptidique. Différentes séries de PCR ont permis d'amplifier un transcrit de 1338 paires de bases, codant une protéine de 445 acides aminés. Une analyse phylogénétique couplée à un alignement de séquences d'autres désaturases (Δ 5D et Δ 6D) ont montré que cette protéine se regroupe avec d'autres FED de poissons (jusqu'à 91 % d'identité de séquence) et présente les différents motifs conservés par ce type de désaturase : un domaine cytochrome b₅ N-terminal typique, plusieurs hélices α transmembranaires et les 3 « boîtes conservées » His – impliquées dans le site catalytique. L'identification formelle de cette enzyme comme étant *pf* Δ 6D a été rendue possible par la

détermination de sa fonction en système hétérologue¹. A partir de ces données expérimentales, nous avons proposé un modèle d'organisation « 2D » de *pf*Δ6D. Cette dernière présente une structure secondaire impliquant en majorité des hélices α et, pour le motif cytochrome b_5 , des feuillets β . Protéine membranaire du réticulum endoplasmique lisse, une analyse par profils d'hydropathie nous a permis de mettre en évidence une structure à 4 hélices α – incluant une « α helical hairpin » – dont les éléments solubles sont orientés vers le cytosol, lieu de synthèse des précurseurs de ses substrats principaux. Malgré l'utilisation de différents modes de prédiction (par homologie, par reconnaissance de conformation et *de novo/ab initio*), ainsi que l'existence de structures cristallographiques d'enzymes apparentées (SCD/Δ9D) mais non homologues, il n'a techniquement pas été possible d'obtenir un modèle 3D suffisamment robuste de cette protéine.

3. *pf*ELOVL5, une élongase de type ELOVL

L'approche génétique, réalisée à partir de matériel biologique frais, a permis d'une part d'isoler la séquence nucléotidique d'une élongase de type ELOVL, et d'autre part d'identifier sa séquence peptidique.

De même que pour *pf*Δ6D, nous avons amplifié par PCR un transcrit de 885 paires de bases, codant une protéine de 294 acides aminés. En combinant une analyse phylogénétique et un alignement de séquences (ELOVL2, 4, 5), nous avons identifié *pf*ELOVL comme étant une élongase du cinquième groupe (ELOVL5). Elle présente en effet les différents motifs conservés caractéristiques : plusieurs hélices α transmembranaires, un signal de rétention au réticulum endoplasmique et les 4 « boîtes conservées » typiques (KEDT, His, Tyr et Gln) – par ailleurs impliquées dans le site catalytique. L'identification formelle de cette enzyme comme étant *pf*ELOVL5 n'a cependant pas été possible malgré une série de tests en système hétérologue². Sur base de la séquence obtenue expérimentalement, il nous a été permis de proposer d'une part un modèle d'organisation « 2D » de *pf*ELOVL5 et d'autre part un modèle 3D. Cette protéine membranaire du réticulum endoplasmique lisse présente une structure secondaire en hélices α , dont 7 ont été prédites être insérées en membrane. Grâce aux méthodes prédictives par reconnaissance de conformation et *de novo/ab initio*, nous avons déterminé deux modèles topologiques de *pf*ELOVL5, dont l'un – suite à son insertion dans une bicouche lipidique de 1-stéaroyl-2-linoléoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine – nous a permis de mettre en évidence deux modes de liaison enzyme-substrat. La technique de l'amarrage moléculaire a en effet permis de montrer des interactions de type liaisons hydrogène et CH- π entre plusieurs résidus des « boîtes conservées » de la protéine et l'un de ses substrats (l'acide γ -linolénique)³.

4. Développements possibles

Les perspectives de ce travail sont nombreuses. L'obtention des séquences nucléotidiques de *pf*Δ6D et *pf*ELOVL5 peut en effet permettre :

¹ La détermination de la fonction de cette protéine a été réalisée dans le cadre d'un projet FNRS-FRFC (#6.8073.70) dans lequel le présent travail s'inscrit en partie.

² Ceux-ci ont été réalisés dans le cadre du projet FNRS-FRFC #6.8073.70.

³ Concernant l'acide arachidonique, l'autre substrat testé, seules des liaisons hydrogène sont impliquées dans l'interaction avec l'enzyme.

- d'une part, d'approfondir les aspects génétiques (approche expérimentale) et modélisation (approche théorique) ;
- d'autre part, d'envisager l'utilisation de techniques de surproduction en système hétérologue⁴ afin d'isoler « physiquement » ces enzymes (approche expérimentale).

A partir de là, plusieurs options sont envisageables pour approfondir la compréhension de leur mécanisme d'action.

Concernant l'approche théorique⁵, la construction de modèles 3D et la découverte de différents modes de liaison au substrat peuvent conduire à des expériences de mutagenèse dirigée afin d'affiner la définition du site catalytique et de déterminer l'importance des résidus-clés impliqués, que ce soit au niveau des interactions directes avec le substrat (liaisons hydrogène et CH- π) ou dans l'établissement d'un environnement favorable à la stabilité de ce dernier. De plus, outre la nécessité d'investiguer le comportement d'acides gras issus de la série des ω 3, il serait intéressant d'étudier la sélectivité des enzymes vis-à-vis de différents PUFA/HUFA et de déterminer s'il existe des mécanismes de compétition et/ou d'exclusion. Par ailleurs, toujours dans l'optique d'affiner notre modèle et ses modes de liaisons, il serait opportun de tester d'autres membranes lipidiques que SLPC, la mécanistique propre aux membranes biologiques étant réputée influencer le comportement des protéines qui y sont insérées.

En ce qui concerne l'approche expérimentale, outre l'approfondissement des aspects génétiques via l'identification d'éventuels variants d'épissage⁶ ou encore l'étude de mécanismes d'activation des gènes responsables de l'expression sélective de ces deux protéines en fonction des espèces, la surexpression et l'isolation physique de ces deux acteurs enzymatiques permettraient de se pencher sur l'étude de leur activité, que ce soit au niveau de leur cinétique, de leur efficacité, de l'existence d'éventuels modulateurs ou encore de mécanismes de régulation des voies métaboliques de synthèse des PUFA/HUFA.

Ces différentes analyses biochimiques peuvent conduire à une approche plus « intégrative » :

- investigation de la distribution tissulaire des acides gras, de leur stockage et de leur métabolisation (cinétique et efficacité enzymatiques) ;
- établissement de profils en acides gras, de bilans corporels, détermination de la digestibilité et de l'influence sur le développement (efficacité enzymatique) ;
- détermination de l'influence sur d'autres voies métaboliques, études protéomiques et de physiologie des systèmes (modulateurs enzymatiques) ;
- ...

En outre, les étapes de mutagenèse dirigée et de sélectivité vis-à-vis du substrat évoquées du point de vue théorique peuvent également se décliner au niveau expérimental à partir de l'isolation physique des protéines d'intérêt.

⁴ Voir à ce sujet : (1) Y. Bai, J.G. McCoy, E.J. Levin, P. Sobrado, K.R. Rajashankar, B.G. Fox, M. Zhou, X-ray structure of a mammalian stearyl-CoA desaturase, *Nature* 524 (2015) 252–256 ; (2) H. Wang, M.G. Klein, H. Zou, W. Lane, G. Snell, I. Levin, K. Li, B.-C. Sang, Crystal structure of human stearyl-coenzyme A desaturase in complex with substrate, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22 (2015) 581–585.

⁵ Ce point ne concerne pour l'instant que *pfELOVL5*, étant donné la difficulté à obtenir une structure 3D théorique de *pf* Δ 6D.

⁶ Cette étape a déjà été réalisée pour *pf* Δ 6D. Voir à ce sujet : F. Geay, E. Tinti, J. Mellery, C. Michaux, Y. Larondelle, E. Perpète, P. Kestemont, Cloning and functional characterization of Δ 6 fatty acid desaturase (FADS2) in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*), *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 191 (2016) 112–125.

Si les différentes pistes envisagées ci-dessus ciblent de manière privilégiée un approfondissement de nos connaissances sur le sujet, notamment au niveau des fondamentaux moléculaires du métabolisme des acides gras chez les poissons (et les vertébrés de manière générale), il ne faudrait pas se cantonner à une (des) étude(s) purement fondamentale(s). Ainsi, la description et la compréhension des acteurs du métabolisme des lipides chez les poissons doivent rencontrer des applications sur le terrain, non seulement en aquaculture, mais également en nutrition humaine afin de fournir des perspectives effectives aux problématiques actuelle et future de l'approvisionnement des populations humaines en ressources alimentaires. Ces aspects débordent largement du domaine de la science, touchant aussi bien l'économique que le politique, le social ou encore le culturel.

ANNEXES

Annexes

1.	TABLEAU A-1. DIVERSITE DES DESATURASES D'ACIDES GRAS.....	85
2.	TABLEAU A-2. DIVERSITE DES ELONGASES D'ACIDES GRAS	90
3.	ARTICLES PUBLIES DANS LE CADRE DE CE TRAVAIL	93

1. Tableau A-1. Diversité des désaturases d'acides gras

Groupe	Activité de désaturation	Réactions	Exemples chez divers organismes ^a
Acyl-ACP désaturases (solubles) ^b	Primo-désaturases	$\Delta 9$ -myristoyl-ACP C14:0 \rightarrow C14:1 $\Delta 9$	<i>px</i> $\Delta 9$ -M-ACP-DES
		$\Delta 4$ -palmitoyl-ACP C16:0 \rightarrow C16:1 $\Delta 4$	<i>cs</i> $\Delta 4$ -P-ACP-DES <i>hh</i> $\Delta 4$ -P, $\Delta 9$ -S-ACP-DES [†]
		$\Delta 6$ -palmitoyl-ACP C16:0 \rightarrow C16:1 $\Delta 6$	<i>ta</i> $\Delta 6$ -P-ACP-DES
		$\Delta 9$ -palmitoyl-ACP C16:0 \rightarrow C16:1 $\Delta 9$	<i>as</i> $\Delta 9$ -P-ACP-DES <i>du</i> $\Delta 9$ -P-ACP-DES
		$\Delta 6$ -stéaroyl-ACP C18:0 \rightarrow C18:1 $\Delta 6$	<i>cs</i> $\Delta 6$ -S-ACP-DES
		$\Delta 9$ -stéaroyl-ACP C18:0 \rightarrow C18:1 $\Delta 9$	<i>at</i> $\Delta 9$ -S-ACP-DES1-6 <i>at</i> SSI2/FAB2 <i>csa</i> $\Delta 9$ -S-ACP-DES <i>hh</i> $\Delta 4$ -P, $\Delta 9$ -S-ACP-DES [†] <i>rc</i> $\Delta 9$ -S-ACP-DES [†]
Acyl-CoA ou acyl-lipide désaturases (membranaires)	Primo-désaturases	$\Delta 5$ C16-20:0 \rightarrow C16-20:1 $\Delta 5$	<i>al</i> AL21 (C16-18) ^{c,d} <i>la</i> $\Delta 5$ DES (C20) ^c
		$\Delta 6$ C16:0 \rightarrow C16:1 $\Delta 6$	<i>rn</i> $\Delta 6$ D
		$\Delta 9$ C14-18:0 \rightarrow C14-18:1 $\Delta 9$ \geq C20:0 \rightarrow \geq C20:1 $\Delta 9$	<i>ch</i> DES-9-1 (\geq C20) <i>cr</i> $\Delta 9$ D (C16) <i>dm</i> DESAT1 (C16-18) ^e <i>dm</i> DESAT2 (C14) ^e <i>ost</i> $\Delta 9$ D (C16/18)
		Stéaroyl-CoA/ $\Delta 9$ C16-18:0 \rightarrow C16-18:1 $\Delta 9$	<i>ce</i> FAT5 (C16) <i>ce</i> FAT6 (C18) <i>ce</i> FAT7 (C18) <i>ch</i> DES-9-2 <i>hs</i> $\Delta 9$ D/SCD1 [†] <i>hs</i> $\Delta 9$ D/SCD5 [†] <i>mm</i> $\Delta 9$ D/SCD1-4 [†] <i>sc</i> OLE1 <i>sp</i> DES-C (C18)
		$\Delta 11$ C14-16:0 \rightarrow C14-16:1 $\Delta 11$	<i>cr</i> $\Delta 11$ D (C14) <i>ep</i> $\Delta 11$ D <i>ost</i> $\Delta 11$ D <i>sl</i> $\Delta 11$ -P-CoA-DES (C16) <i>ts</i> $\Delta 11$ D (C16)

Acyl-CoA ou acyl-lipide désaturases (membranaires)	« Methyl-end »	Δ14	C16:0 → C16:1Δ14	<i>ost</i> Δ14D
		ω6/Δ12	C16-18:1Δ9 → C16-18:2Δ9,12	<i>at</i> FAD2 (C18) <i>ce</i> FAT2 (C18) <i>kl</i> FAD2 (C18) <i>ma</i> Δ12D (C18) <i>sk</i> Δ12D
		ω5/Δ13	C18:1Δ11 → C18:2Δ11,c-13	<i>rn</i> FADS3
		ω3/Δ11	C14:1Δ9 → C14:2Δ9,11	<i>ep</i> Δ11D
		ω3/Δ15	C18:2n-6 → C18:3n-3 C20:2n-6 → C20:3n-3	<i>at</i> FAD3 (C18) <i>ce</i> FAT1 (C18) <i>kl</i> FAD3 (C18) <i>ma</i> ω3D <i>sk</i> FAD3 (C18)
		ω3/Δ17	C20:3n-6 → C20:4n-3 C20:4n-6 → C20:5n-3	<i>ce</i> FAT1 <i>sd</i> Δ17D
	« Methyl-end »	ω6/ω3 (Δ12Δ15 et Δ12Δ15Δ17)	C14:1Δ9 → C14:2Δ9,12 C16:2Δ9,12 → C16:3Δ9,12,15 C18:1n-9 → C18:2n-6 C18:2n-6 → C18:3n-3 C18:3n-6 → C18:4n-3 C20:3n-6 → C20:4n-3 C20:4n-6 → C20:5n-3	<i>ac</i> Δ12Δ15D (C16-18) ^d <i>ce</i> FAT2 (C14-18) <i>cpu</i> DES-X (C16-20)
	« Front-end »	Δ4	C22:4n-6 → C22:5n-6 C22:5n-3 → C22:6n-3	<i>ig</i> D4 <i>hs</i> Δ4D/FADS2
		Δ5	C18:2n-6 → C18:3n-6 C18:3n-3 → C18:4n-3 C20:2n-6 → C20:3n-6 C20:3n-3 → C20:4n-3 C20:3n-6 → C20:4n-6 C20:4n-3 → C20:5n-3	<i>al</i> AL10 (C20) ^{c,d} <i>al</i> AL21 (C18) ^{c,d} <i>ce</i> FAT4 (C20) <i>hs</i> Δ5D/FADS1 (C20) <i>ma</i> Δ5D (C20)
		Δ6	C18:2n-6 → C18:3n-6 C18:3n-3 → C18:4n-3 C24:4n-6 → C24:5n-6 C24:5n-3 → C24:6n-3	<i>al</i> AL1 (C18) ^f <i>bo</i> Δ6D (C18) ^c <i>ce</i> FAT3 (C18) <i>cp</i> DES6 (C18) <i>gc</i> DES6 (C18) <i>mm</i> Δ6D/FADS2 <i>mr</i> Δ6D (C18) <i>pri</i> Δ6D (C18) ^c <i>rn</i> Δ6D/FADS2 <i>rni</i> D6C/D/E (C18) ^c <i>sp</i> DES-D (C18) ^d
		Δ8	C20:2n-6 → C20:3n-3 C20:3n-6 → C20:4n-3	<i>pa</i> Δ8D/FADS2
	Autres	Δ9Δ12	C14-16:0 → C14-16:1Δ9 C16-18:1Δ9 → C16-18:2Δ9,12	<i>ad</i> Δ9Δ12D
		FADS4	Inconnue	Mammifères

^a *ac*, *Acanthamoeba castellanii*; *ad*, *Acheta domesticus*; *al*, *Anemone leveillei*; *as*, *Asclepias syriaca*; *at*, *Arabidopsis thaliana*; *bo*, *Borago officinalis*; *ce*, *Caenorhabditis elegans*; *ch*, *Calanus hyperboreus*; *cr*, *Choristoneura rosaceana*; *cs*, *Coriandrum sativum*; *csa*, *Cucumis sativus*; *cp*, *Ceratodon purpureus*; *cpu*, *Claviceps purpurea*; *dm*, *Drosophila melanogaster*; *du*, *Doxantha unguis-cati*; *ep*, *Epiphyas postvittana*; *gc*, *Glossomastix chrysoplasta*; *hh*, *Hedera helix*; *hs*, *Homo sapiens*; *ig*, *Isochrysis galbana*; *kl*, *Kluyveromyces lactis*; *la*, *Limnanthus alba*; *ma*, *Mortierella alpina*; *mm*, *Mus musculus*; *mr*, *Mucor rouxii*; *ost*, *Ostrinia* sp.; *pa*, *Papio anubis*; *pri*, *Primula* sp.; *px*, *Pelargonium hortorum*; *rc*, *Ricinus communis*; *rn*, *Rattus norvegicus*; *rni*, *Ribes nigrum*; *sc*, *Saccharomyces cerevisiae*; *sd*,

Saprolegnia diclina ; *sk*, *Saccharomyces kluyveri* ; *sl*, *Spodoptera littoralis* ; *sp*, *Spirulina platensis* ; *ta*, *Thunbergia alata* ; *ts*, *Thalassiosira pseudonana*.

^b Les acyl-ACP désaturases, à l'exception de la $\Delta 9$ -stéaroyl-ACP, sont uniquement exprimées dans les graines.

^c Ces désaturases sont uniquement exprimées dans les graines.

^d Ces désaturases ne possèdent pas de domaine cytochrome b_5 fusionné.

^e DESAT1 et DESAT2 sont uniquement exprimées chez les femelles.

^f Cette désaturase est la seule de type « *front-end* » à avoir été isolée ailleurs que dans les graines (feuilles).

[†] Structure cristallographique disponible pour l'espèce citée [1–4].

- [1] Y. Lindqvist, W. Huang, G. Schneider, J. Shanklin, Crystal structure of delta9 stearoyl-acyl carrier protein desaturase from castor seed and its relationship to other di-iron proteins, *EMBO J.* 15 (1996) 4081–4092.
- [2] J.E. Guy, E. Whittle, D. Kumaran, Y. Lindqvist, J. Shanklin, The crystal structure of the ivy Delta-4-16:0-ACP desaturase reveals structural details of the oxidized active site and potential determinants of regioselectivity, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 19863–19871.
- [3] H. Wang, M.G. Klein, H. Zou, W. Lane, G. Snell, I. Levin, K. Li, B.-C. Sang, Crystal structure of human stearoyl-coenzyme A desaturase in complex with substrate, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 22 (2015) 581–585.
- [4] Y. Bai, J.G. McCoy, E.J. Levin, P. Sobrado, K.R. Rajashankar, B.G. Fox, M. Zhou, X-ray structure of a mammalian stearoyl-CoA desaturase, *Nature* 524 (2015) 252–256.
- [5] J. Shanklin, C. Somerville, Stearoyl-acyl-carrier-protein desaturase from higher plants is structurally unrelated to the animal and fungal homologs, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88 (1991) 2510–2514.
- [6] A. Kachroo, J. Shanklin, E. Whittle, L. Lapchyk, D. Hildebrand, P. Kachroo, The Arabidopsis stearoyl-acyl carrier protein-desaturase family and the contribution of leaf isoforms to oleic acid synthesis, *Plant Mol. Biol.* 63 (2007) 257–271.
- [7] E.B. Cahoon, A.M. Cranmer, J. Shanklin, J.B. Ohlrogge, Delta-6 Hexadecenoic acid is synthesized by the activity of a soluble delta-6 palmitoyl-acyl carrier protein desaturase in *Thunbergia alata* endosperm, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 27519–27526.
- [8] E.B. Cahoon, S. Shah, J. Shanklin, J. Browse, A determinant of substrate specificity predicted from the acyl-acyl carrier protein desaturase of developing cat's claw seed, *Plant Physiol.* 117 (1998) 593–598.
- [9] E.B. Cahoon, S.J. Coughlan, J. Shanklin, Characterization of a structurally and functionally diverged acyl-acyl carrier protein desaturase from milkweed seed, *Plant Mol. Biol.* 33 (1997) 1105–1110.
- [10] E.B. Cahoon, J. Shanklin, J.B. Ohlrogge, Expression of a coriander desaturase results in petroselinic acid production in transgenic tobacco, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 (1992) 11184–11188.
- [11] E. Whittle, E.B. Cahoon, S. Subrahmanyam, J. Shanklin, A multifunctional acyl-acyl carrier protein desaturase from *Hedera helix* L. (English ivy) can synthesize 16- and 18-carbon monoene and diene products, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 28169–28176.
- [12] E.B. Cahoon, J.B. Ohlrogge, Metabolic Evidence for the Involvement of a [delta]4-Palmitoyl-Acyl Carrier Protein Desaturase in Petroselinic Acid Synthesis in Coriander Endosperm and Transgenic Tobacco Cells, *Plant Physiol.* 104 (1994) 827–837.
- [13] T. Tonon, D. Harvey, R. Qing, Y. Li, T.R. Larson, I.A. Graham, Identification of a fatty acid delta-11-desaturase from the microalga *Thalassiosira pseudonana*, *FEBS Lett.* 563 (2004) 28–34.
- [14] D.J. Schultz, E.B. Cahoon, J. Shanklin, R. Craig, D.L. Cox-Foster, R.O. Mumma, J.I. Medford, Expression of delta-9 14:0-acyl carrier protein fatty acid desaturase gene is necessary for the production of omega-5 anacardic acids found in pest-resistant geranium (*Pelargonium hortorum*), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 8771–8775.
- [15] F. Rodriguez, D.L. Hallahan, J.A. Pickett, F. Camps, Characterization of the delta-11-palmitoyl-CoA-desaturase from *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae), *Insect Biochem. Mol. Biol.* 22 (1992) 143–148.

-
- [16] W. Liu, H. Jiao, N.C. Murray, M. O'Connor, W.L. Roelofs, Gene characterized for membrane desaturase that produces (E)-11 isomers of mono- and diunsaturated fatty acids, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 620–624.
- [17] G. Hao, M. O'Connor, W. Liu, W.L. Roelofs, Characterization of Z/E11- and Z9-desaturases from the obliquebanded leafroller moth, *Choristoneura rosaceana*, *J. Insect Sci.* 2 (2002) 1–7.
- [18] W.L. Roelofs, W. Liu, G. Hao, H. Jiao, A.P. Rooney, C.E.J. Linn, Evolution of moth sex pheromones via ancestral genes, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99 (2002) 13621–13626.
- [19] C. Labeur, R. Dallerac, C. Wicker-Thomas, Involvement of *desat1* gene in the control of *Drosophila melanogaster* pheromone biosynthesis, *Genetica* 114 (2002) 269–274.
- [20] R. Dallerac, C. Labeur, J.-M. Jallon, D.C. Knipple, W.L. Roelofs, C. Wicker-Thomas, A Delta 9 desaturase gene with a different substrate specificity is responsible for the cuticular diene hydrocarbon polymorphism in *Drosophila melanogaster*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97 (2000) 9449–9454.
- [21] J.E. Stuckey, V.M. McDonough, C.E. Martin, The OLE1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the delta-9 fatty acid desaturase and can be functionally replaced by the rat stearyl-CoA desaturase gene, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 20144–20149.
- [22] L.F.C. Castro, J.M. Wilson, O. Gonçalves, S. Galante-Oliveira, E. Rocha, I. Cunha, The evolutionary history of the stearyl-CoA desaturase gene family in vertebrates, *BMC Evol. Biol.* 11 (2011) 132.
- [23] T. Vanhercke, P. Shrestha, A.G. Green, S.P. Singh, Mechanistic and structural insights into the regioselectivity of an acyl-CoA fatty acid desaturase via directed molecular evolution, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 12860–12869.
- [24] D. Meesapyodsuk, X. Qiu, Structure determinants for the substrate specificity of Acyl-CoA Δ 9 desaturases from a marine copepod, *ACS Chem. Biol.* 9 (2014) 922–934.
- [25] D. Meesapyodsuk, D.W. Reed, S. Cheevadhanarak, P. Deshnum, P.S. Covello, Probing the mechanism of a cyanobacterial Delta-9 fatty acid desaturase from *Spirulina platensis* C1 (*Arthrospira* sp. PCC 9438), *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 129 (2001) 831–835.
- [26] J. Okuley, J. Lightner, K. Feldmann, N. Yadav, E. Lark, J. Browse, Arabidopsis FAD2 gene encodes the enzyme that is essential for polyunsaturated lipid synthesis, *Plant Cell* 6 (1994) 147–158.
- [27] E. Sakuradani, M. Kobayashi, T. Ashikari, S. Shimizu, Identification of Δ 12-fatty acid desaturase from arachidonic acid-producing *Mortierella* fungus by heterologous expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the fungus *Aspergillus oryzae*, *Eur. J. Biochem.* 261 (1999) 812–820.
- [28] K. Watanabe, T. Oura, H. Sakai, S. Kajiware, Yeast Δ 12 Fatty Acid Desaturase: Gene Cloning, Expression, and Function, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68 (2004) 721–727.
- [29] E. Sakuradani, T. Abe, K. Iguchi, S. Shimizu, A novel fungal omega-3-desaturase with wide substrate specificity from arachidonic acid-producing *Mortierella alpina* 1S-4, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66 (2005) 648–654.
- [30] T. Oura, S. Kajiware, *Saccharomyces kluyveri* FAD3 encodes an ω 3 fatty acid desaturase, *Microbiology* 150 (2004) 1983–1990.
- [31] N.S. Yadav, A. Wierzbicki, M. Aegerter, C.S. Caster, L. Pérez-Grau, A.J. Kinney, W.D. Hitz, J.R.J. Booth, B. Schweiger, K.L. Stecca, S.M. Allen, M. Blackwell, R.S. Reiter, T.J. Carlson, S.H. Russell, K.A. Feldmann, J. Pierce, J. Browse, Cloning of higher plant omega-3 fatty acid desaturases, *Plant Physiol.* 103 (1993) 467–476.
- [32] J.P. Spychalla, A.J. Kinney, J. Browse, Identification of an animal omega-3 fatty acid desaturase by heterologous expression in Arabidopsis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 1142–1147.
- [33] S.L. Pereira, Y.-S. Huang, E.G. Bobik, A.J. Kinney, K.L. Stecca, J.C.L. Packer, P. Mukerji, A novel omega3-fatty acid desaturase involved in the biosynthesis of eicosapentaenoic acid, *Biochem. J.* 378 (2004) 665–671.
- [34] O. Sayanova, R. Haslam, I. Guschina, D. Lloyd, W.W. Christie, J.L. Harwood, J.A. Napier, A bifunctional Δ 12, Δ 15-desaturase from *Acanthamoeba castellanii* directs the synthesis of highly unusual n-1 series unsaturated fatty acids, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 36533–36541.
-

- [35] X.-R. Zhou, A.G. Green, S.P. Singh, *Caenorhabditis elegans* $\Delta 12$ -desaturase FAT-2 is a bifunctional desaturase able to desaturate a diverse range of fatty acid substrates at the $\Delta 12$ and $\Delta 15$ positions, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 43644–43650.
- [36] K. Kainou, Y. Kamisaka, K. Kimura, H. Uemura, Isolation of delta-12 and omega-3-fatty acid desaturase genes from the yeast *Kluyveromyces lactis* and their heterologous expression to produce linoleic and alpha-linolenic acids in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast* 23 (2006) 605–612.
- [37] D. Meesapyodsuk, D.W. Reed, P.S. Covello, X. Qiu, Primary structure, regioselectivity, and evolution of the membrane-bound fatty acid desaturases of *Claviceps purpurea*, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 20191–20199.
- [38] L. V Michaelson, J.A. Napier, M. Lewis, G. Griffiths, C.M. Lazarus, A.K. Stobart, Functional identification of a fatty acid Delta5-desaturase gene from *Caenorhabditis elegans*, *FEBS Lett.* 439 (1998) 215–218.
- [39] E.B. Cahoon, E.-F. Marillia, K.L. Stecca, S.E. Hall, D.C. Taylor, A.J. Kinney, Production of fatty acid components of meadowfoam oil in somatic soybean embryos, *Plant Physiol.* 124 (2000) 243–251.
- [40] O. Sayanova, R. Haslam, M. Venegas Caleron, J.A. Napier, Cloning and characterization of unusual fatty acid desaturases from *Anemone leveillei*: Identification of an acyl-coenzyme A C20 Delta5-desaturase responsible for the synthesis of sciadonic acid, *Plant Physiol.* 144 (2007) 455–467.
- [41] H.P. Cho, M. Nakamura, S.D. Clarke, Cloning, expression, and fatty acid regulation of the human delta-5 desaturase, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 37335–37339.
- [42] J.A. Napier, S.J. Hey, D.J. Lacey, P.R. Shewry, Identification of a *Caenorhabditis elegans* Delta6-fatty-acid-desaturase by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochem. J.* 330 (1998) 611–614.
- [43] O. Sayanova, M.A. Smith, P. Lapinskas, A.K. Stobart, G. Dobson, W.W. Christie, P.R. Shewry, J.A. Napier, Expression of a borage desaturase cDNA containing an N-terminal cytochrome b5 domain results in the accumulation of high levels of delta6-desaturated fatty acids in transgenic tobacco, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 4211–4216.
- [44] H.P. Cho, M.T. Nakamura, S.D. Clarke, Cloning, expression, and nutritional regulation of the mammalian Delta-6 desaturase, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 471–477.
- [45] H. Guillou, V. Rioux, D. Catheline, J.-N. Thibault, M. Bouriel, S. Jan, S. D'Andrea, P. Legrand, Conversion of hexadecanoic acid to hexadecenoic acid by rat $\Delta 6$ -desaturase, *J. Lipid Res.* 44 (2003) 450–454.
- [46] O. Sayanova, R. Haslam, M. Venegas-Calérón, J.A. Napier, Identification of *Primula* “front-end” desaturases with distinct n-6 or n-3 substrate preferences, *Planta* 224 (2006) 1269–1277.
- [47] L.-Y. Song, W.-X. Lu, J. Hu, Y. Zhang, W.-B. Yin, Y.-H. Chen, S.-T. Hao, B.-L. Wang, R.R.-C. Wang, Z.-M. Hu, Identification and functional analysis of the genes encoding Delta6-desaturase from *Ribes nigrum*, *J. Exp. Bot.* 61 (2010) 1827–1838.
- [48] H.M. Whitney, L. V. Michaelson, O. Sayanova, J.A. Pickett, J.A. Napier, Functional characterisation of two cytochrome b5-fusion desaturases from *Anemone leveillei*: The unexpected identification of a fatty acid $\Delta 6$ -desaturase, *Planta* 217 (2003) 983–992.
- [49] S. Na-Ranong, K. Laoteng, P. Kittakoo, M. Tantichareon, S. Cheevadhanarak, Substrate specificity and preference of Delta6-desaturase of *Mucor rouxii*, *FEBS Lett.* 579 (2005) 2744–8.
- [50] T.Y. Hsiao, B. Holmes, H.W. Blanch, Identification and functional analysis of a delta-6 desaturase from the marine microalga *Glossomastix chrysoplata*, *Mar. Biotechnol.* 9 (2007) 154–165.
- [51] P. Sperling, M. Lee, T. Girke, U. Zähringer, S. Stymne, E. Heinz, A bifunctional Delta-6-fatty acyl acetylenase/desaturase from the moss *Ceratodon purpureus*, *Eur. J. Biochem.* 267 (2000) 3801–3811.
- [52] A. Hongsthong, S. Subudhi, M. Sirijuntarat, S. Cheevadhanarak, Mutation study of conserved amino acid residues of *Spirulina* delta-6-acyl-lipid desaturase showing involvement of histidine 313 in the regioselectivity of the enzyme, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66 (2004) 74–84.
- [53] S. D'andrea, H. Guillou, S. Jan, D. Catheline, J.-N. Thibault, M. Bouriel, V. Rioux, P. Legrand, The same rat Delta6-desaturase not only acts on 18- but also on 24-carbon fatty acids in very-long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis, *Biochem. J.* 364 (2002) 49–55.

- [54] W.J. Park, K.S.D. Kothapalli, P. Lawrence, C. Tyburczy, J.T. Brenna, An alternate pathway to long-chain polyunsaturates: the FADS2 gene product Delta8-desaturates 20:2n-6 and 20:3n-3, *J. Lipid Res.* 50 (2009) 1195–1202.
- [55] K. Reisner, M. Lehtonen, M. Storvik, T. Jantson, M. Lakso, J.C. Callaway, G. Wong, Trans fat diet causes decreased brood size and shortened lifespan in *Caenorhabditis elegans* delta-6-desaturase mutant fat-3, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 25 (2011) 269–279.
- [56] S.L. Pereira, A.E. Leonard, Y.-S. Huang, L.-T. Chuang, P. Mukerji, Identification of two novel microalgal enzymes involved in the conversion of the ω 3-fatty acid, eicosapentaenoic acid, into docosahexaenoic acid, *Biochem. J.* 384 (2004) 357–366.
- [57] H.G. Park, W.J. Park, K.S.D. Kothapalli, J.T. Brenna, The fatty acid desaturase 2 (FADS2) gene product catalyzes delta-4 desaturation to yield n-3 docosahexaenoic acid and n-6 docosapentaenoic acid in human cells, *FASEB J.* 29 (2015) 3911–3919.
- [58] V. Rioux, F. Pédrone, H. Blanchard, C. Duby, N. Boulrier-Monthéan, L. Bernard, E. Beauchamp, D. Catheline, P. Legrand, *Trans*-vaccenate is Δ 13-desaturated by FADS3 in rodents, *J. Lipid Res.* 54 (2013) 3438–3452.
- [59] L.F.C. Castro, Ó. Monroig, M.J. Leaver, J. Wilson, I. Cunha, D.R. Tocher, Functional Desaturase Fads1 (Δ 5) and Fads2 (Δ 6) Orthologues Evolved before the Origin of Jawed Vertebrates, *PLoS One* 7 (2012) e31950.
- [60] L. V Michaelson, C.M. Lazarus, G. Griffiths, J.A. Napier, K.A. Stobart, Isolation of a Δ 5-Fatty Acid Desaturase Gene from *Mortierella alpina*, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 19055–19059.

2. Tableau A-2. Diversité des élongases d'acides gras

Elongase ^a	Réactions ^b	Exemples chez divers organismes ^c
ELOVL1	SFA : C18 → C28 MUFA : C20 → C24	hsELG1/ELOVL1 maMAELO (C20 → C24) mmSSC1/ELOVL1 scELO2p/FEN1/GNS1/VBM2 scELO3p/SUR4/VBM1/SRE1/APA1
ELOVL2	PUFA : C20 → C24	hsELG3/ELOVL2 mmSSC2/ELOVL2
ELOVL3	SFA : C16 → C24 MUFA : C18 → C20	hsCIG30/ELG6/ELOVL3 mmCIG30/ELOVL3 scELO2p/FEN1/GNS1/VBM2
ELOVL4	VLC-SFA : ≥ C24 VLC-PUFA : ≥ C24	hsELOVL4 mmELOVL4
ELOVL5	PUFA : C18 → C22	ceCEELO1 (C18 → C20) ceELO2 (C18 → C20) ciELO hsHELO1/ELG4/ELOVL5 igASE1 (C18 → C20) maGLELO/EL2 (C18 → C20) ofELO1 (C18 → C20) ofELO2 (C20 → C22) pavELO (C20 → C22) pinELO (C18 → C20) pirELO (C18 → C22) ppPSE1 (C18 → C20) mELO1 tpELO1 (C18 → C20) tpELO2 (C20 → C22) xlELO

ELOVL6	SFA : C16 → C18 (MUFA : C18 → C20)	ceCEELO1 (SFA) hsLCE/FACE maEL1 mmLCE/FACE rnELO2
ELOVL7	(SFA : C16 → C22) MUFA : C18 → C20 (PUFA : C18 → C20)	hsELOVL7
Autres	SFA : C4 → C18	hsLCE/FACE (C12 → C16) mmLCE/FACE (C12 → C16) scELO1p (C14 → C16) tbELO1 (C4 → C10) tbELO2 (C10 → C14) tbELO3 (C14 → C18)
	SFA : C16 → C28	atKCS1-21 (élongases FAE-like et CER-like)
	MUFA : C12 → C18	ceCEELO1 (C16 → C18) ddELOA (C16:1Δ9 → C18:1Δ11) hsLCE/FACE (C12 → C16) mmLCE/FACE (C12 → C16)
	MUFA : C16 → C22	atKCS1-21 (élongases FAE-like et CER-like) [†]
	PUFA : C18:2 → C20:2	atKCS2/DAISY (élongase FAE-like) ^d atKCS18/FAE1 (élongase FAE-like) ^e
	Inconnue	atFEN1 (élongase ELO-like) atSUR4/GNS1 (élongase ELO-like)

^a ELOVL1 est impliquée dans la synthèse des sphingolipides et la formation des membranes ; ELOVL2 et ELOVL5 sont impliquées dans la synthèse des HUFA ; ELOVL3 est impliquée dans la formation des triglycérides dans le tissu adipeux brun ; ELOVL4 est principalement présente dans la rétine, le cerveau et les testicules.

^b Les parenthèses indiquent une activité faible et/ou secondaire.

^c *at*, *Arabidopsis thaliana* ; *ce*, *Caenorhabditis elegans* ; *ci*, *Ciona intestinalis* ; *dd*, *Dictyostelium discoideum* ; *hs*, *Homo sapiens* ; *ig*, *Isochrysis galbana* ; *ma*, *Mortierella alpina* ; *mm*, *Mus musculus* ; *os*, *Ostreococcus tauri* ; *pav*, *Pavlova* sp. ; *pin*, *Phytophthora infestans* ; *pin*, *Pythium irregulare* ; *pp*, *Physcomitrella patens* ; *rn*, *Rattus norvegicus* ; *sc*, *Saccharomyces cerevisiae* ; *tb*, *Trypanosoma brucei* ; *tp*, *Thalassiosira pseudonana* ; *xl*, *Xaenopus laevis*.

^d DAISY est impliquée dans la synthèse de cires et exprimée dans l'épiderme, les racines, les graines, les fleurs et les fruits.

^e FAE1 est impliquée dans la synthèse de triglycérides de stockage et seulement exprimée dans les graines.

[†] Modèle 3D disponible pour KCS1, KCS13 et KCS19 [1].

- [1] J. Joubès, S. Raffaele, B. Bourdenx, C. Garcia, J. Laroche-Traineau, P. Moreau, F. Domergue, R. Lessire, The VLCFA elongase gene family in *Arabidopsis thaliana*: Phylogenetic analysis, 3D modelling and expression profiling, *Plant Mol. Biol.* 67 (2008) 547–566.
- [2] Y. Ohno, S. Suto, M. Yamanaka, Y. Mizutani, S. Mitsutake, Y. Igarashi, T. Sassa, A. Kihara, ELOVL1 production of C24 acyl-CoAs is linked to C24 sphingolipid synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 18439–18444.
- [3] Y.-A. Moon, N.A. Shah, S. Mohapatra, J.A. Warrington, J.D. Horton, Identification of a Mammalian Long Chain Fatty Acyl Elongase Regulated by Sterol Regulatory Element-binding Proteins, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 45358–45366.
- [4] S.L. Pereira, A.E. Leonard, Y.-S. Huang, L.-T. Chuang, P. Mukerji, Identification of two novel microalgal enzymes involved in the conversion of the ω3-fatty acid, eicosapentaenoic acid, into docosahexaenoic acid, *Biochem. J.* 384 (2004) 357–366.

- [5] T.K. Zank, U. Zählingen, C. Beckmann, G. Pohnert, W. Boland, H. Holtorf, R. Reski, J. Lerchl, E. Heinz, Cloning and functional characterisation of an enzyme involved in the elongation of delta-6-polyunsaturated fatty acids from the moss *Physcomitrella patens*, *Plant J.* 31 (2002) 255–268.
- [6] T. Das, J. Thurmond, E. Bobik, A. Leonard, J. Parker-Barnes, Y.-S. Huang, P. Mukerji, Polyunsaturated fatty acid-specific elongation enzymes, *Biochem. Soc. Trans.* 28 (2000) 658–660.
- [7] J.M. Parker-Barnes, T. Das, E. Bobik, A.E. Leonard, J.M. Thurmond, L.-T. Chaung, Y.-S. Huang, P. Mukerji, Identification and characterization of an enzyme involved in the elongation of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 8284–8289.
- [8] T. Naganuma, Y. Sato, T. Sassa, Y. Ohno, A. Kihara, Biochemical characterization of the very long-chain fatty acid elongase ELOVL7, *FEBS Lett.* 585 (2011) 3337–3341.
- [9] A.E. Leonard, S.L. Pereira, H. Sprecher, Y.-S. Huang, Elongation of long-chain fatty acids, *Prog. Lipid Res.* 43 (2004) 36–54.
- [10] C.-S. Oh, D.A. Toke, S. Mandala, C.E. Martin, ELO2 and ELO3, homologues of the *Saccharomyces cerevisiae* ELO1 gene, function in fatty acid elongation and are required for sphingolipid formation, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 17376–17384.
- [11] D.A. Toke, C.E. Martin, Isolation and Characterization of a Gene Affecting Fatty Acid Elongation in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 18413–18422.
- [12] L. Bach, J.-D. Faure, Role of very-long-chain fatty acids in plant development, when chain length does matter, *C. R. Biol.* 333 (2010) 361–370.
- [13] F. Beaudoin, L. V Michaelson, S.J. Hey, M.J. Lewis, P.R. Shewry, O. Sayanova, J.A. Napier, Heterologous reconstitution in yeast of the polyunsaturated fatty acid biosynthetic pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 6421–6426.
- [14] D. Nugteren, The enzymic chain elongation of fatty acids by rat-liver microsomes, *Biochim. Biophys. Acta* 106 (1965) 280–290.
- [15] A. Jakobsson, R. Westerberg, A. Jakobsson, Fatty acid elongases in mammals: Their regulation and roles in metabolism, *Prog. Lipid Res.* 45 (2006) 237–249.
- [16] P. Tvrdik, R. Westerberg, S. Silve, A. Asadi, A. Jakobsson, B. Cannon, G. Loison, A. Jakobsson, Role of a new mammalian gene family in the biosynthesis of very long chain fatty acids and sphingolipids, *J. Cell Biol.* 149 (2000) 707–717.
- [17] S.H. Lee, J.L. Stephens, K.S. Paul, P.T. Englund, Fatty acid synthesis by elongases in trypanosomes, *Cell* 126 (2006) 691–699.
- [18] E. Sakuradani, Advances in the Production of Various Polyunsaturated Fatty Acids through Oleaginous Fungus *Mortierella alpina* Breeding, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74 (2010) 908–917.
- [19] A. Meyer, H. Kirsch, F. Domergue, A. Abbadi, P. Sperling, J. Bauer, P. Cirpus, T.K. Zank, H. Moreau, T.J. Roscoe, U. Zählinger, E. Heinz, Novel fatty acid elongases and their use for the reconstitution of docosahexaenoic acid biosynthesis, *J. Lipid Res.* 45 (2004) 1899–1909.
- [20] T.M. Haslam, L. Kunst, Extending the story of very-long-chain fatty acid elongation, *Plant Sci.* 210 (2013) 93–107.
- [21] B.J. Blacklock, D. Kelley, S. Patel, A fatty acid elongase ELO with novel activity from *Dictyostelium discoideum*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 374 (2008) 226–230.
- [22] P.L. Vrinten, T. Hoffman, J. Bauer, X. Qiu, Specific protein regions influence substrate specificity and product length in polyunsaturated fatty acid condensing enzymes, *Biochemistry* 49 (2010) 3879–3886.

3. Articles publiés dans le cadre de ce travail

- F. Geay, **E. Tinti**, J. Mellery, C. Michaux, Y. Larondelle, E. Perpète, P. Kestemont, Cloning and functional characterization of $\Delta 6$ fatty acid desaturase (FADS2) in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*), *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 191 (2016) 112–125.
- **E. Tinti**, F. Geay, M. Lopes Rodrigues, P. Kestemont, E.A. Perpète, C. Michaux, Molecular cloning and 3D model of a fatty-acid elongase in a carnivorous freshwater teleost, the European perch (*Perca fluviatilis*), *3 Biotech.* 9 (2019) 242.



Cloning and functional characterization of $\Delta 6$ fatty acid desaturase (FADS2) in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*)

F. Geay^a, E. Tinti^b, J. Mellery^c, C. Michaux^b, Y. Larondelle^c, E. Perpète^b, P. Kestemont^{a,*}

^a Unité de Recherche en Biologie Environnementale et Evolutive (URBE), Université de Namur (UNamur), Rue de Bruxelles, 61, 5000 Namur, Belgium

^b Unité de Chimie Physique Théorique et Structurale, Université de Namur (UNamur), Rue de Bruxelles 61, 5000 Namur, Belgium

^c Institut des Sciences de la Vie, UCLouvain, Croix du Sud, 2/L7.05.08, 1348 Louvain-la-Neuve, Belgium

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 July 2015

Received in revised form 29 August 2015

Accepted 12 October 2015

Available online 18 October 2015

Editor: T.P. Mommsen

Keywords:

Eurasian perch

Freshwater fish

Highly unsaturated fatty acids

Fatty acid desaturase 2

Tissue expression

ABSTRACT

The Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) is a freshwater carnivorous species of high interest to diversify inland aquaculture. However, little is known about its ability to bioconvert polyunsaturated fatty acids (PUFAs) from plant oils into long chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFAs). In this study, special attention has been given to the fatty acid desaturase 2 (FADS2) which is commonly described to be a rate-limiting enzyme of the LC-PUFA biosynthesis. This work reports on the cloning, tissue expression and functional characterization of the Eurasian perch *fads2*, but also on the cloning of two alternative splicing transcripts named *fads2-AS1* and *fads2-AS2*. The *fads2* cDNA cloned is composed of an open reading frame (ORF) of 1338 nucleotides (nt) and encodes a protein of 445 amino acids. This deduced amino acid sequence displays the typical structure of microsomal FADS2 including two transmembrane domains and an N-terminal cytochrome b_5 domain with the “HPGG” motif. Quantitative real-time PCR assay of *fads2*, *fads2-AS1* and *fads2-AS2* expressions revealed that the *fads2* transcript was mainly expressed in the liver and intestine and exhibited a typical gene expression pattern of freshwater species while *fads2-AS1* and *fads2-AS2* genes were highly expressed in the brain, followed by the liver and intestine. Functional characterization of Eurasian perch FADS2 in transgenic yeast showed a fully functional $\Delta 6$ desaturation activity toward C_{18} PUFA substrates, without residual $\Delta 5$ and $\Delta 8$ desaturase activities.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Fish are the main dietary source of long chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFAs) such as eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n–3) and docosahexaenoic acid (DHA: 22:6n–3) from the n–3 series, and the arachidonic acid (ARA, 20:4n–6) from the n–6 series. These LC-PUFAs are well known to be essential for fish development, and also provide some benefits for human health by reducing cardiovascular and neurological diseases (Fernandes and Venkatraman, 1993). In response to the worldwide stagnation of fisheries, the aquaculture activity rapidly increased throughout the world since the 1990s to cover the consumer's demand. Unfortunately, the high n–3 LC-PUFA concentrations in farmed fish flesh are maintained by the use of fish oils, themselves largely produced from feed grade marine fisheries. This situation is not sustainable in the long term since it further reduces the marine fish stocks. The use of terrestrial plant ingredients to replace fish oil and fish meal in the fish farmed nutrition has been investigated since the 90s. However, contrary to fish oil, vegetable oils are deprived in LC-PUFA but are rich in fatty acids with 18 carbon atoms. Most

of these oils contain a significant proportion of polyunsaturated fatty acids (PUFAs), some being particularly rich in linoleic acid (LA, 18:2n–6), while a few contain mostly α -linolenic acid (ALA, 18:3n–3). Thus, the possibility of using transgenic terrestrial plant with endogenous LC-PUFA biosynthesis capacities has been examined recently (Ruiz-Lopez et al., 2015).

The C_{18} PUFA can be converted into LC-PUFA through a succession of desaturation and elongation reactions, described as the “Sprecher pathway” in vertebrates (Sprecher et al., 1995). Synthesis of EPA and ARA respectively from ALA and LA precursors involves a $\Delta 6$ desaturation (FADS2) to produce 18:4n–3 and 18:3n–6, then an elongation (ELOVL5) to 20:4n–3 and 20:3n–6 respectively and then followed by a $\Delta 5$ desaturation (FADS1) (Cook, 1996). An alternative pathway involving an elongation of the C_{18} precursor to produce 20:3n–3, followed by a $\Delta 8$ desaturation catalyzed by FADS2 has been described in many teleost fish (Monroig et al., 2011). However, as demonstrated by the authors, marine species exhibited higher $\Delta 8$ desaturation activity than freshwater/diadromous fish. According to the “Sprecher pathway”, the synthesis of DHA from EPA is achieved by two elongation steps, followed by a second $\Delta 6$ desaturation step, and a final β -oxidation reaction. Additionally to this conventional pathway, a shorter pathway to produce DHA from EPA through a $\Delta 4$ desaturation and an elongation has been recently described in the white-spotted spinefoot (*Siganus*

* Corresponding author. Tel.: +32 81 724 363.

E-mail address: patrick.kestemont@unamur.be (P. Kestemont).

canaliculatus) (Li et al., 2010), the Senegalese sole (*Solea senegalensis*) (Morais et al., 2012), the pike silverside (*Chirostoma estor*) (Fonseca-Madrigal et al., 2014) and the striped snakehead (*Channa striata*) (Kuah et al., 2015). Among teleosts, it is well established that marine fish species have a very low LC-PUFA biosynthesis capacities from PUFA precursors compared with anadromous and freshwater/diadromous fish species such as salmonids and zebrafish. The main hypothesis proposed to explain this difference is a loss of LC-PUFA endogenous biosynthesis capacity in response to trophic position. Indeed, most carnivorous fish species obtain their LC-PUFA directly through the ingestion of their LC-PUFA-rich preys (Zheng et al., 2004). At the molecular level, this loss of function is attributed to deficiencies of desaturase and/or elongase enzymatic activities (Tocher, 2003).

To improve the knowledge on LC-PUFA synthesis ability in fish, several fatty acid desaturase cDNAs have been cloned in fish species (Seiliez et al., 2001; Zheng et al., 2004), including a single bifunctional $\Delta 6/\Delta 5$ desaturase gene from the freshwater zebrafish (*Danio rerio*) (Hastings et al., 2001) and distinct *fads2* and *fads1* genes from the cartilaginous catshark (*Scyliorhinus canicula*) (Castro et al., 2012). With the exception of zebrafish, only *fads2* cDNAs have been cloned from teleost fish such as Atlantic salmon (*Salmo salar*) (Hastings et al., 2004; Zheng et al., 2005), Atlantic cod (*Gadus morhua*) (Tocher et al., 2006), European seabass (*Dicentrarchus labrax*) (González-Rovira et al., 2009; Santigosa et al., 2011), gilthead sea bream (*Sparus aurata*) (Zheng et al., 2004) and cobia (*Rachycentron canadum*) (Zheng et al., 2009). However, as it has been described above, some of these FADS2 proteins display a diversification of their desaturation activities ($\Delta 4$, $\Delta 5$ and $\Delta 8$ desaturation activities) which might be associated to their respective environments and their specific food.

Currently, the endogenous potential of freshwater carnivorous fish to biosynthesize LC-PUFA is still unclear. It is suggested that the supply of LC-PUFA from preys could possibly impair the LC-PUFA biosynthesis capacity in these species. Investigations on the bioconversion of ALA and LA in freshwater carnivorous species including Northern pike (*Esox lucius*) and Murray cod (*Maccullochella peelii peelii*) have so far presented contradictory results (Henderson et al., 1995; Francis et al., 2007). However, the recent functional characterization of one *fads2* gene with additional $\Delta 4$ desaturase activity toward 22:5n-3 in the striped snakehead might suggest endogenous LC-PUFA biosynthesis capacities in this carnivorous freshwater species (Kuah et al., 2015). The endogenous LC-PUFA biosynthesis potential was investigated in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) because of the interest of this species in the diversification of the inland aquaculture in Europe (Kestemont and Dabrowski, 1996; Henrotte et al., 2011). The relatively high DHA concentrations recorded in the flesh of Eurasian perch after a nutritional challenge with different LC-PUFA levels in

diets suggested a relative high endogenous potential of this species to synthesize LC-PUFA from C_{18} precursors (Xu and Kestemont, 2002; Henrotte et al., 2011). However, to date, there is no information available in Eurasian perch regarding the functionality of genes involved in LC-PUFA biosynthesis.

The main objective of the present study was to clone and characterize the *fads2* transcript from Eurasian perch as a first step to understand the molecular mechanisms implicated in the response of this species to vegetable oil feeding.

2. Material and methods

2.1. Tissue samples

Five Eurasian perch juveniles maintained in the facilities of the University of Namur (Belgium) and fed a fish-based diet were euthanized with an overdose of MS-222 (aminobenzoic acid). The liver, brain, anterior intestine, posterior intestine, kidney, muscle, gill, heart and spleen were sampled from each fish and directly stored at -80°C .

2.2. Cloning of putative fatty acid desaturase from Eurasian perch

Total RNA from each liver was extracted using 1 mL of Extract-all® reagent (Eurobio, Courtaboeuf, France) following the manufacturer's instructions. Based on the nucleic acid concentration measured with a Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific Wilmington, USA), 20 μg of total RNA was treated with the RTS DNase™ kit (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA) to avoid gDNA contaminations. Finally, 1 μg of total RNA was reverse-transcribed using the iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The identification of Eurasian perch *fads2* transcript was investigated through a cDNA mix obtained with a blend of 10 μL of each liver template (total of 50 μL).

Degenerate primers, named Fads-deg-F and Fads-deg-R, were designed from multiple alignments with orthologous sequences of desaturases from the GenBank database (*D. labrax*: ACD10793; *S. aurata*: AAL17639; *D. rerio*: NP_571720; *Oncorhynchus mykiss*: AF478472; *Cyprinus carpio*: AAG25711; *S. salar*: AF478472; *Homo sapiens*: NP_037534.3) (Table 1). PCR amplification was performed using the proofreading polymerase from the Advantage® 2 Polymerase Mix (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA) under the following conditions: 2 min initial denaturation at 94°C , 37 cycles of 30 s denaturation at 95°C , 30 s annealing at 55°C and 1 min elongation at 68°C , and 2 min of final extension at 68°C . Migration of PCR products in a 1.2% agarose gel allowed the identification of a single amplicon at the expected length. The PCR product was purified with the High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Mannheim, Germany) according to the

Table 1

Primers used in the different steps of this study.

Aim	Transcript	Primer name	Primer sequence (5'-3')	Annealing temperature (T) ($^{\circ}\text{C}$)
Partial cDNA cloning	Fads2	Fads-deg-F1	ACVGAGCCSAGCCAGGACC	66.0
		Fads-deg-R1	KTGATTCATCTGWTACCCA	47.3
5' UTR cloning	Fads2	Fads-5'-R1	GCCTCCAGCAGAAGGATGTG	64.0
		Fads-5'-R2	AGAAGAACAAGCCGAGCTCGA	52.0
3' UTR cloning	Fads2	Fads-3'-F1	CACCATGATTTCCCGCCGTGA	51.2
		Fads-3'-F2	TGCGCTACCTGTGCTGTTCTATA	50.2
ORF cloning	Fads2	Fads2-dig-F	CCCAAGCTTATGGAGGTGGAGGCCAGCT	62.1
		Fads2-dig-R	GCGGGATCCTCATTTATGCAGATATGCATC	56.5
qPCR	Fads2	Fads2-qPCR-F	CCACCTGGGTACATCCTTC	64.0
		Fads2-qPCR-R	GCATGATGGCGCTCAGAAAG	62.0
		Fads2-AS1-qPCR-F	CAATGCCGGTTTCTCTTCAT	58.0
		Fads2-AS1-qPCR-R	TTAGCGTGATGCTGGAAATG	53.5
		Fads2-AS2-qPCR-F	TCTTCAGTAAGAACCCTGATGTC	54.0
		Fads2-AS2-qPCR-R	TATTCCTGYGAAGTTTCA	54.0
		Ef1 α -qPCR-F	GGAAATTCGTCGTGGATACG	60.0
		Ef1 α -qPCR-R	GGGTGGTTCAGGATGATGAC	62.0
		β -Actin-qPCR-F	ACCTTCTACAACGAGCTGAGAGTT	50.6
		β -Actin-qPCR-R	AGTGGTACGACCAGAGGCATAC	51.6

From this sequence, specific primers named Fads-5'-R1 and Fads-5'-R2 for the 5' RACE reaction, and Fads-3'-F1 and Fads-3'-F2 for the 3' RACE reaction, were designed to obtain the cDNA full length of the desaturase transcript (Table 1). Amplification of cDNA ends was done

with the SMARTer™ Race cDNA Amplification kit (Clontech Laboratories) according to the instructions. After cloning and sequencing the isolated cDNA fragments as described above, the specific primers Fads2-FL-F and Fads2-FL-R were designed in the 5' and 3' UTR regions in order to amplify the *fads2* full-length ORF. The PCR reaction was done with the Advantage cDNA polymerase Mix under the following conditions: 2 min initial denaturation at 94 °C, 37 cycles of 45 s denaturation at 95 °C, 45 s annealing at 55 °C, 2 min elongation at 68 °C, and 5 min of final extension at 68 °C. The PCR fragments were cloned into the pGEM®-T Easy Vector (Promega) and sequenced (Magrogen). Finally, several clones revealed a cDNA of 1338 nt named *fads2* (GenBank: KM924433) and two alternative splicing named *fads2-AS1* and *fads2-AS2*.

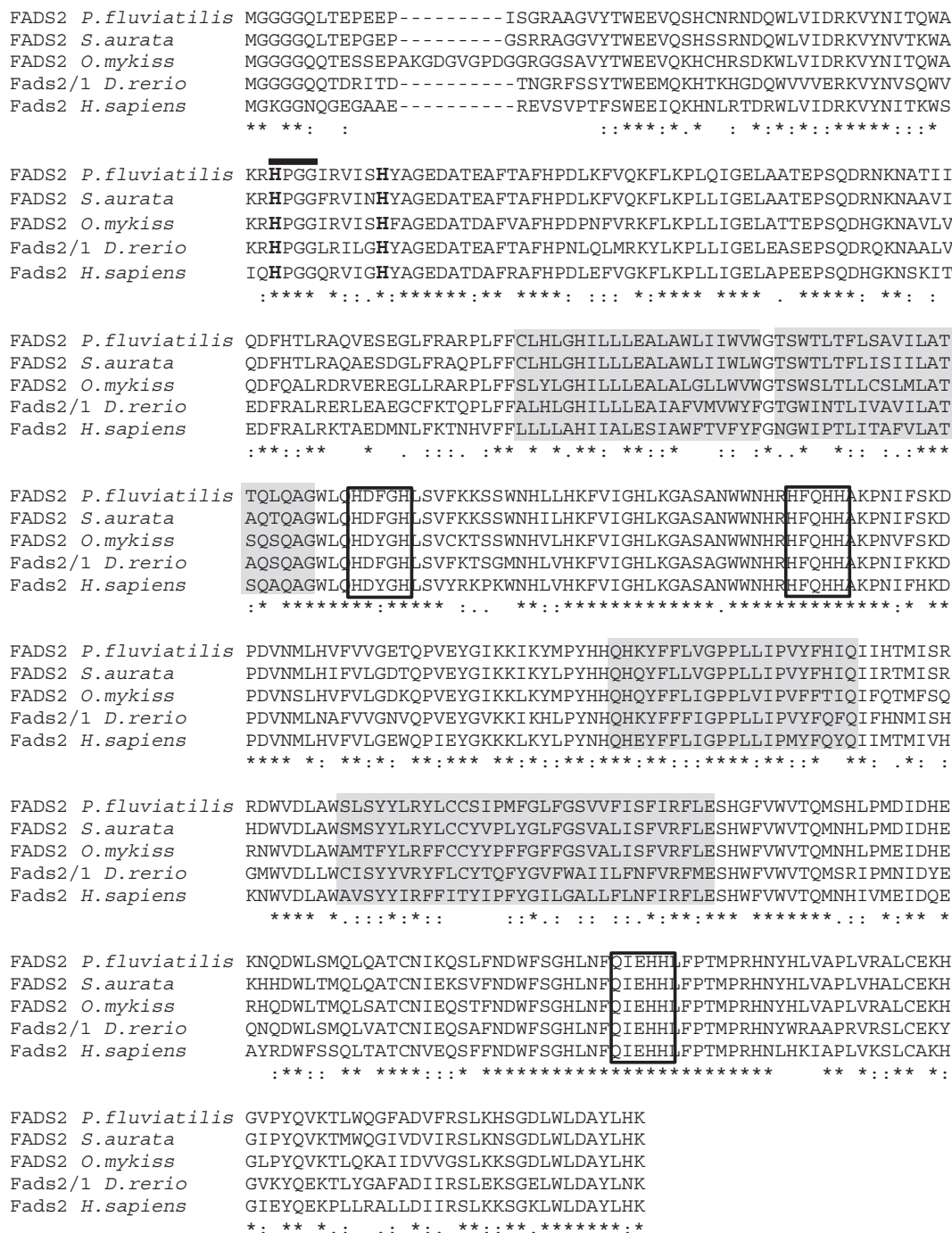


Fig. 1. Alignment of the deduced amino acid sequence of the fatty acid desaturase 2 from Eurasian perch. The heme-binding motif "HPGG" of the cytochrome b_5 -domain is underlined while the two transmembrane domains, including the four TM-helices, are shaded. The three histidine-rich regions are framed. The two highly conserved histidine positions are in bold.

2.3. Phylogenetic analysis

The deduced amino acid sequence of the newly cloned Eurasian perch *fads2* transcript was aligned with FADS1 and FADS2 orthologues. The FADS2 amino acid sequence from *Mortierella alpina* was used as outgroup sequence to root the tree. The tree was constructed by the neighbor-joining method (Saitou & Nei, 1987) using PhyML and MEGA5 softwares. Confidence in the resulting phylogenetic tree branch topology was measured with 1000 bootstrap iterations.

2.4. Hydropathy profiles

Hydropathy profiles were built with several programs, such as DAS (BRC, Hungarian Academy of Sciences, Hungary), HMMTOP (IE, Hungarian Academy of Sciences, Hungary), Phobius (SBC, Stockholm University, Sweden), PredictProtein (Technische Universität München, Germany & Columbia University at New York, USA), SOSUI (Applied Physics, Nagoya University, Japan), SPOCTOPUS (SBC, Stockholm University, Sweden), TM-Finder (SickKids, Toronto University, Canada), TMHMM (CBS, Technical University of Denmark, Denmark), TMPred (EMBNet, University Nijmegen Medical Centre, The Netherlands) and TopPred (BITC, Institut Pasteur & RPBS, Université Paris VII-Diderot, France). The accuracy of model helicity and hydrophobicity was assessed by consensus building.

2.5. Functional characterization of Eurasian perch *fads2* cDNA by heterologous expression in yeast

The specific sequence corresponding to the ORF of the Eurasian perch *fads2* transcript was amplified by PCR with the primer pairs named Fads2-dig-F/Fads2-dig-R containing HindIII and BamHI restriction sites (Table 1). PCR was performed with the Advantage cDNA polymerase Mix from a mixture of liver cDNA as template. PCR conditions were an initial denaturation step at 94 °C for 5 min, followed by 38 cycles of 30 s denaturation, 30 s annealing at 56 °C, 2 min elongation at

68 °C, followed by a final step of elongation for 5 min at 68 °C. The PCR product with the expected length was cloned into the pGEM®-T Easy Vector (Promega). Several recombinant plasmids were subsequently extracted, purified and sequenced to allow the identification of the *fads2* transcript. 2 µg recombinant plasmid containing *fads2* cDNA was digested with the corresponding restriction enzymes (Promega), ligated into the pYES2 expression vector (Invitrogen) with the T4 DNA ligase (Promega) and transfected into *E. coli* competent cells. After verification of the sequence of the recombinant pYES2 plasmid, *Saccharomyces cerevisiae* strain INVSc1 (Invitrogen, Gent, Belgium) was transformed with the pYES2-*fads2* recombinant plasmid according to the manufacturer's instructions. Yeasts transformed with the recombinant plasmid were selected on solid minimal medium plates without uracil.

The cultures transformed with recombinant plasmids were grown at 30 °C in minimal medium containing 0.67% (w/v) nitrogen base (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 0.19% (w/v) drop out medium, and 2% (w/v) raffinose. Expression of the transgene was induced by adding 2% (w/v) galactose and 1% (w/v) tergitol in a culture diluted at an initial OD₆₀₀ of 0.3 in 5 mL of final volume. For each assay, all the fatty acids tested as substrate were previously dissolved in absolute ethanol and supplemented at the appropriate concentration in the medium culture described above. The Eurasian perch desaturase functionality was tested with the following fatty acids: 18:3n-3 (0.5 mM), 18:2n-6 (0.5 mM), 20:3n-6 (0.5 mM), 20:3n-3 (0.5 mM), 20:4n-3 (0.5 mM) and 24:5n-3 (1 mM). All the incubations were carried out at 30 °C for 2 days in a shaking agitator. After incubations, the cultures were centrifuged for 1 min at 5000 ×g and washed with 5 mL of sterile water. After another centrifugation for 1 min at 5000 ×g, the cultures were suspended in 1 mL of sterile water and stored at -20 °C.

2.6. Fatty acid analysis from transgenic yeasts

Total cellular lipids were extracted according to a method adapted from the one described in details by Schneider et al. (2012). Briefly, 800 µL of yeast culture suspended in sterile water as described

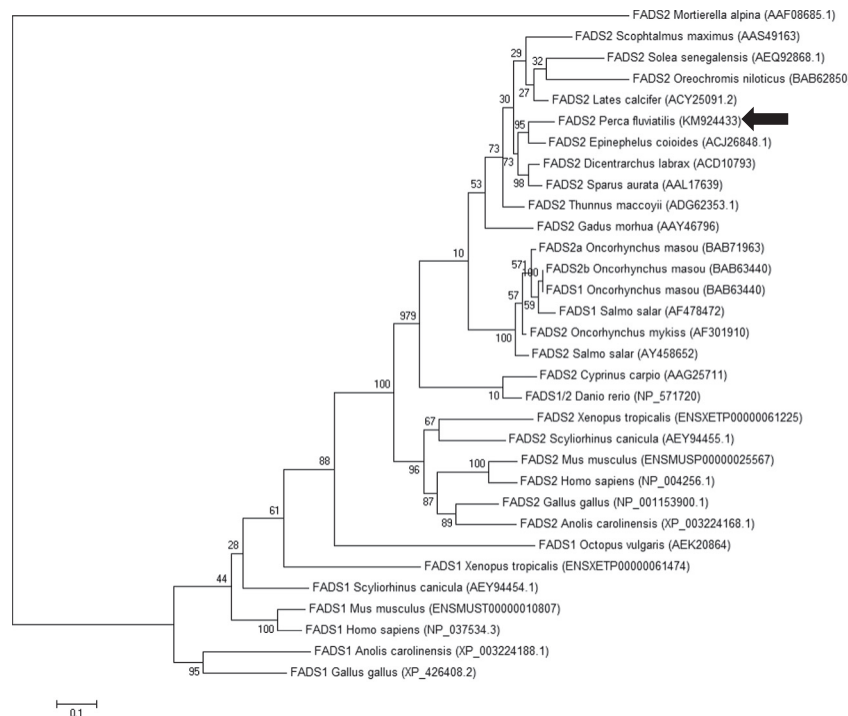


Fig. 2. Phylogeny of FADS1 and FADS2 deduced amino acid sequences. The functional FADS2 protein of *Perca fluviatilis* is indicated with an arrow. The tree was constructed by the neighbor-joining method (Saitou & Nei, 1987) using PhyML and MEGA5 softwares. The horizontal branch length is proportional to amino acid substitution rate per site. The values represent the frequencies with which the tree topology presented here was replicated after 1000 bootstrap iterations. The FADS2 amino acid sequence from *Mortierella alpina* was used as outgroup sequence to root tree.

Fads2 atgggaggtggaggccagctaacggagccagaagagccgatcagcgggagagctgctggt
Fads2-AS1 atgggaggtggaggccagctaacggatgcagaagagccgatcagcgggagagctgctggt
Fads2-AS2 atgggaggtggaggccagctaacggatgcagaagagccgatcagcgggagagctgctggt

Fads2 gtctacacctgggaggaggtgcaaagccactgcaaccggaatgaccagtggctgggtgata
Fads2-AS1 gtctacacctgggaggaggtgcaaagccactgcaaccggaatgaccagtggctgggtgata
Fads2-AS2 gtctacacctgggaggaggtgcaaagccactgcaaccggaatgaccagtggctgggtgata

Fads2 gatcgaaaggtttacaacatcacacagtgggcccacacacaccaggagggattcagatc
Fads2-AS1 gatcgaaaggtttacaacatcacacagtggacacacacacaccaggagggattcagatc
Fads2-AS2 gatcgaaaggtttacaacatcacacagtggacacacacacaccaggagggattcagatc

Exon 1 | Exon 2
Fads2 atcagccactatgctggagaggaatgccacggaggcattcactgcttttcatccagattta
Fads2-AS1 atcagccattatgctggagagaatgccacggaggcattcactgcttttcatccagattta
Fads2-AS2 atcagccattatgctggagagaatgccacggaggcattcactgcttttcatccagattta

Fads2 aagtttgtgcaaaagtttctgaagccgctgcagattggagagctggcagcgacagagccc
Fads2-AS1 aagtttgtgcaaaagtttctgaagccgctgcagattggagagctggcagcgacagagccc
Fads2-AS2 aagtttgtgcaaaagtttctgaagccgctgcagattggagagctggcagcgacagagccc

Exon 2 | Exon 3
Fads2 agccaggaccgaaacaaaaatgcaaccatcatacaggatttccatactttacgtgctcag
Fads2-AS1 agccaggaccgaaacaaaaatgcaaccatcatacaggatttccatactttacgtgctcag
Fads2-AS2 agccaggaccgaaacaaaaatgcaaccatcatacaggatttccatactttacgtgctcag

Fads2 gtggagagcgagggctctgtttcgagctcggccttgttcttctgcctccacctgggtcac
Fads2-AS1 gtggagagcgagggctctgtttcgagctcggccttgttcttctgcctccacctgggtcac
Fads2-AS2 gtggagagcgagggctctgtttcgagctcggccttgttcttctgcctccacctgggtcac

Fads2 atccttctgctggaggccctgcctggctgatcatctgggtctggggaactagctggact
Fads2-AS1 atccttctgctggaggccctgcctggctgatcatctgggtctggggaactagctggact
Fads2-AS2 atccttctgctggaggccctgcctggctgatcatctgggtctggggaactagctggact

Exon 3
Fads2 ctgacctttctgagcgccgtcatattagcaaccactcag-----
Fads2-AS1 ctgacctttctgagcgccatcatgctagcaaccgctcaggtgattcgaacatcattatct
Fads2-AS2 ctgacctttctgagcgccatcatgctagcaaccgctcag-----

Exon 4
Fads2 -----ctgca
Fads2-AS1 gttattgttgttgacgaactgtaagtcaatgccggtttctcttcatcttctgtagtctgca
Fads2-AS2 -----ctgca

V I V V D E L Stop

Fads2 ggctggatggctgcagcatgactttggccacctgtctgtcttcaagaagtccagctggaa
Fads2-AS1 ggctggatggctgcagcatgactttggccacctgtctgtcttcaagaagtccagctggaa
Fads2-AS2 ggctggatggctgcagcatgactttggccacctgtctgtcttcaagaagtccagctggaa

Exon 4 | Exon 5
Fads2 tcacttgttgacaaagtttgcatttggctcatttgaaggagcgtctgccaaactgggtggaa
Fads2-AS1 tcacttgttgacaaagtttgcatttggctcatttgaaggagcgtctgccaaactgggtggaa
Fads2-AS2 tcacttgttgacaaagtttgcatttggctcatttgaaggagcgtctgccaaactgggtggaa

Fads2 tcaccggcatttccagcatcacgctaaccaccaacatcttcagtaaggaccctgatgtcaa
Fads2-AS1 tcaccggcatttccagcatcacgctaaccaccaacatcttcagtaaggaccctgatgtcaa
Fads2-AS2 tcaccggcatttccagcatcacgctaaccaccaacatcttcagtaaggaccctgatgtcga

Exon 5 | Exon 6
Fads2 catgttgcacgtctttttagtggagaaactcaaccagtggagtatggcataaaaaagat
Fads2-AS1 catgttgcacatcttctgagtggagaaactcaaccagtggagtatggcataaaaaagat
Fads2-AS2 catgttgcacatcttctgagtggagaaactcaaccagtggagtatggcataaaaaagat

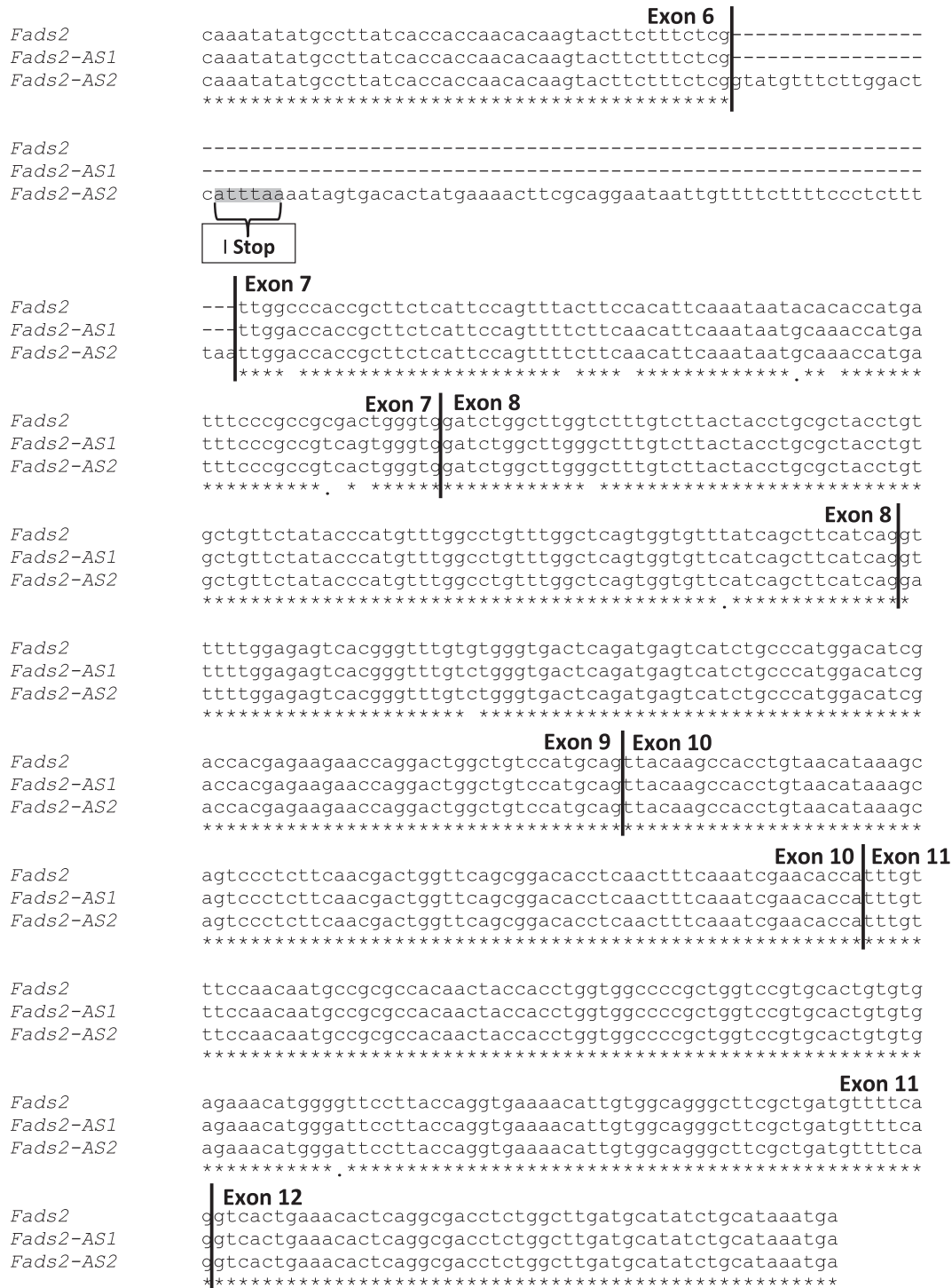


Fig. 3. Exon composition of Eurasian perch *fads2*, *fads2-AS1*, and *fads2-AS2* transcripts. Inter-exon junctions are shown by vertical black separations. Asterisks correspond to the nucleotides conserved between sequences. Retention of the nucleotide sequences between exon 3/exon 4 and exon 6/exon 7 inter-exon junctions is indicated in the alignment. Partial translation of the *fads2-AS1* and *fads2-AS2* transcripts is indicated in boxes to show the presence of the stop codon.

above was transferred into Pyrex tubes and lipids were extracted with 5 mL of chloroform/methanol/KCl 0.88% (2:2:1.8, v:v:v) (Biosolve, Valkenswaard, The Netherlands). After centrifugation, the supernatant was discarded and the sample was collected in a new Pyrex tube to be dried under nitrogen. The lipids were then methylated at 70 °C by the incubation of the sample with 0.1 M KOH in methanol for 1 h, followed by the addition of 1.2 M HCl in methanol and incubation during 15 min. Fatty acid methyl esters were then collected by adding hexane (Biosolve) and separated by gas–liquid chromatography. The GC Trace

(Thermo Finnigan, Milan, Italy) was equipped with an RT2560 capillary column (100 m × 0.25 mm internal diameter, 0.2 µm film thickness) (Restek, Bellefonte, USA), an automatic injector and a flame ionization detector kept at a constant temperature of 255 °C. The carrier gas was H₂ and used at a constant pressure of 200 kPa. The temperature program was as follows: an initial temperature of 80 °C, which progressively increased at 25 °C/min up to 175 °C; a holding temperature of 175 °C during 25 min; an increase at 10 °C/min up to 205 °C; a holding temperature of 205 °C during 4 min; an increase at 10 °C/min up to 215 °C; a holding

temperature of 215 °C during 25 min; an increase at 10 °C/min up to 235 °C and a holding temperature of 235 °C during 10 min. A decrease at 20 °C/min was then imposed down to the initial temperature of 80 °C. Each peak was identified by comparison of retention times with pure methyl ester standards purchased from Larodan (Malmö, Sweden) and from Nu-Check Prep (Elysian, MN, USA). Data processing was operated with the ChromQuest software (version 5.0, Thermo Finnigan). Results were then expressed in g/100 g of total identified fatty acids.

2.7. *Fads2* Eurasian perch tissue distribution

The liver, brain, intestine, kidney, muscle, gill, heart and spleen were sampled from 5 Eurasian perch juveniles fed a commercial diet containing fish ingredients (ME-1.8MP Presta, 55% protein and 15% lipid, Sketting, Stavanger, Norway). Total RNA was extracted from 50 to 100 mg of each sample tissue, with the EXTRACT'ALL (Eurobio), according to the manufacturer's recommendations. After quantification of nucleic acids with a spectrophotometer, 20 µg of total RNA from each sample was treated with the RTS DNase kit to avoid gDNA contaminations. After this treatment, 1 µg of total RNA was reverse-transcribed into cDNA using the iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories). Relative *fads2*, *fads2-AS1* and *fads2-AS2* expressions were investigated by real-time quantitative RT-PCR using specific primers (Table 1). Specific amplification from the cDNA samples was performed using the iQ™SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories). Thermal cycling and fluorescence detection were conducted in a StepOnePlus Real Time PCR System (Applied System) under the following conditions: 10 min of initial denaturation at 95 °C, 40 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C. After each run, amplification of single amplicon was confirmed by analyzing the melt curve and sequencing some of the PCR products.

3. Results

3.1. Cloning of fatty acid desaturase from Eurasian perch

Starting from degenerate primers designed on fish desaturase alignments, a partial transcript encoding a desaturase was amplified. The complete transcript was synthesized by 5' and 3' RACE RT-PCR. The cloning of the PCR product obtained from primers designed in the UTR regions allowed identifying a putative Eurasian perch desaturase transcript composed of 1338 bp and encoding a putative protein of 445 amino acids. As indicated in the alignment (Fig. 1), the putative cytochrome b₅-like domain (HPGG) and the three characteristic histidine boxes (H¹⁸²xxxH¹⁸⁶, H²¹⁹xxHH²³³ and Q³⁸⁴xxHH³⁸⁸) were conserved in this transcript. Phylogenetic analysis comparing the Eurasian perch amino acid sequence with those deduced from *fads1* and *fads2* cDNAs from fish and other vertebrates showed that Eurasian perch desaturase transcript clustered with the sequence deduced from *fads2* cDNA from *Epinephelus coioides*, *D. labrax* and *S. aurata*, all being carnivorous marine fish. Moreover, the cluster with desaturases from freshwater species was less strong (Fig. 2). Amino acid sequence pairwise comparison of Eurasian perch FADS2 with FADS2 of sea bream, rainbow trout, zebrafish and human revealed an identity of 87%, 77%, 69% and 65% respectively.

In addition to this desaturase transcript, the cloning of the PCR products obtained from the primers designed in the UTR regions allowed identifying two alternative RNA splicing variants, named *fads2-AS1* and *fads2-AS2*. The *fads2-AS1* was characterized by an insertion of 76 nt between the exon 3 and the exon 4, while the *fads2-AS2* variant was characterized by an insertion of 79 nt in the junction between exons 6 and 7 (Fig. 3). The retention of these nucleotide sequences between inter-exon junctions induced a modification of the ORF. Consequently, a stop codon appeared prematurely in the putative amino acid sequences deduced from these alternative splicing transcripts.

3.2. Hydropathy profiles

Hydropathy profiles of Eurasian perch FADS2 predict four TM-helices respectively among amino acids 135–155, 157–177, 263–283 and 300–330 (Fig. 4A). Front-end desaturase conserved patterns are also shown. The three histidine boxes are located in the cytoplasmic loop (H¹⁸²xxxH¹⁸⁶ and H²¹⁹xxHH²³³) or in the C-terminal extremity (Q³⁸⁴xxHH³⁸⁸). The N-terminal cytochrome b₅-like domain stretches from amino acid 36 to 78 and contains the heme-binding motif HPGG. Hydropathy profiles of several fish species and human FADS2 were compared (Fig. 4B). All sequences possess the four TM-helices located at the same position, except for rainbow trout, for which the *fads2* ORF is shifted by 9 amino acids as compared to the other fishes (10 if compared to human). The C¹³⁵...W¹⁵⁵ and T¹⁵⁷...G¹⁷⁷ ones form the first transmembrane domain, and the last two each constitute a single TM domain (three in total).

3.3. Tissue distribution of desaturase transcripts

The relative *fads2* gene expression in the liver, brain, intestine, kidney, muscle, gill, heart and spleen from Eurasian perch was investigated by the real-time quantitative RT-PCR method (Fig. 5). *Fads2* was mainly expressed in the liver, followed by the brain, anterior intestine, kidney and muscle, while detection of this transcript was very weak in the gill, heart and spleen. *Fads2-AS1* and *fads2-AS2* alternative transcripts had globally the same relative gene expression patterns than the *fads2* transcript except that the maximal expression was observed in the brain instead of the liver.

3.4. Functional characterization in yeast

The functional characterization of Eurasian perch FADS2 protein was performed by heterologous expression in yeast (*S. cerevisiae*). Its activity was assessed by incubation of recombinant yeasts with Δ6 (18:3n–3, 18:2n–6, 24:5n–3), Δ5 (20:4n–3, 20:3n–6) and Δ8 (20:3n–3) desaturase substrates (Fig. 6, Table 2). Recombinant yeast containing pYES2-FADS2 exhibited stearidonic acid (18:4n–3) and gamma-linoleic acid (18:3n–6) contents when their respective desaturation substrates, namely 18:3n–3 and 18:2n–6, were added to the liquid medium. The 18:3n–3 and 18:2n–6 conversion rates were estimated at about 35% and 7%, respectively. In addition, no EPA (20:5n–3) and ARA (20:4n–6) products were detected when eicosatetraenoic acid (20:4n–3) and dihomo-γ-linoleic acid (20:3n–6) were added to the liquid medium. Similarly, no Δ6-desaturation and Δ8-desaturation products were found when tetracosapentaenoic acid (24:5n–3) and eicosatrienoic acid (20:3n–3) were respectively added in the liquid medium.

4. Discussion

The characterization of molecular actors involved in LC-PUFA biosynthesis is an essential step in the understanding of variable endogenous LC-PUFA synthesis capacities among fish species. In a context of fish oil replacement by plant oils in aquafeeds, previous studies mainly focused on fish species of interest in aquaculture such as marine carnivorous species (Zheng et al., 2004; Tocher et al., 2006; Zheng et al., 2009; Yamamoto et al., 2010; Morais et al., 2012), salmonids (Hastings et al., 2004; Zheng et al., 2005) and freshwater species (Ren et al., 2012; Tanomman et al., 2013). According to these studies performed on the functional characterization of desaturases and elongases and their regulations when fish were fed a plant oil-based diet, it is suggested that freshwater species and salmonids exhibit higher abilities in LC-PUFA endogenous synthesis than marine carnivorous species. However, the endogenous capacity of freshwater carnivorous species like Eurasian perch to biosynthesize LC-PUFA is poorly documented. Thus, this work represents a first step

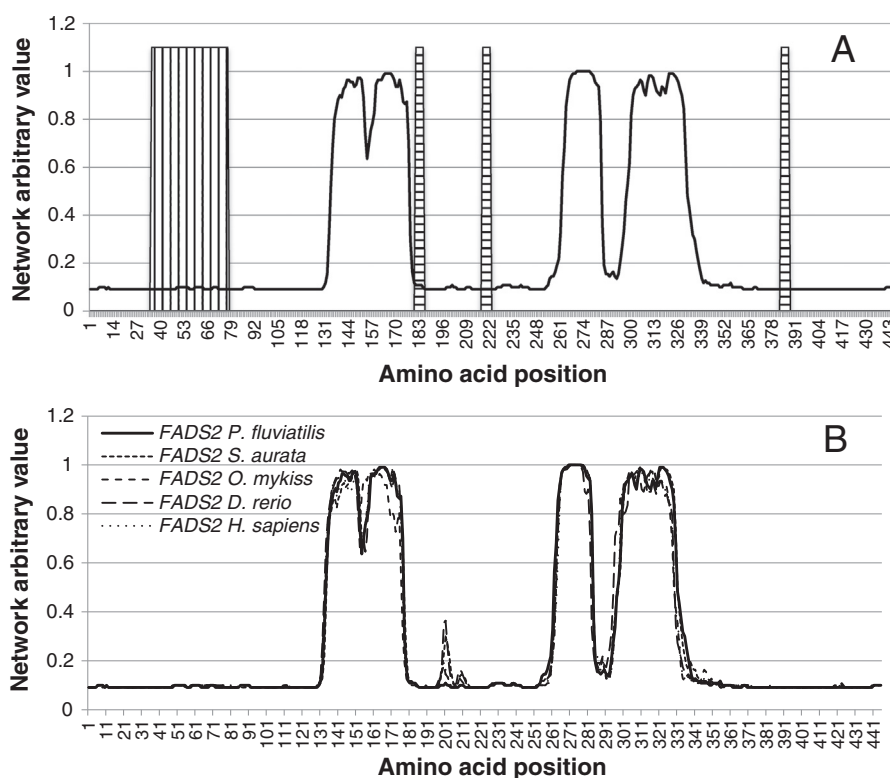


Fig. 4. (A) Hydropathy profile of Eurasian perch FADS2. Peaks indicate the transmembrane α -helices. The vertical and horizontal shaded boxes show the localisation of the N-terminal cytochrome b_5 -like domain and the three conserved histidine boxes respectively. (B) Compared hydropathy profiles of some fish and human FADS2. The GenBank accession numbers of the aligned amino acid sequences are as follows: *Perca fluviatilis* (KM924433), *Sparus aurata* (GQ162822), *Oncorhynchus mykiss* (AF301910), *Danio rerio* (NP_571720), and *Homo sapiens* (NP_004256.1). In order not to shift the alignment, the A¹⁴KGDGVGPD²² amino acids of the *O. mykiss* sequence have been removed.

in the characterization of the endogenous potential of Eurasian perch to bioconvert PUFA into LC-PUFA.

The sequence analysis of the new cloned *fads2* cDNA reveals the presence of some characteristic features of this enzyme family (Hashimoto et al., 2008). The Eurasian perch *fads2* transcript is composed of three histidine boxes (HXXXH, HXXHH and QXXHH), a putative cytochrome b_5 -like domain, and the heme-binding motif HPGG. As an endoplasmic reticulum membrane-bound enzyme, $\Delta 6$ desaturase is assumed to present two hydrophobic regions spanning twice through the ER membrane and consisting of two antiparallel transmembrane α -helices (Stukey et al., 1990; Shanklin et al., 1994). Hydropathy profiles of Eurasian perch FADS2 confirm this assumption, with four TM-helices respectively among amino acids 135–155, 157–177, 263–283 and 300–330 (Fig. 4A), which are conserved among all vertebrates (Fig. 4B).

The Eurasian perch FADS2 identified in this study encodes a protein of 445 amino acids, which is more similar to the sequences deduced for marine carnivorous species (*E. cooides*, *S. aurata* and *D. labrax*) than for freshwater species (*C. carpio*, *Oreochromis niloticus*) and salmonids (*S. salar*, *O. mykiss*). The functional characterization of the Eurasian perch FADS2 in yeast allowed detecting stearidonic acid (18:4n–3) and gamma-linolenic acid (18:3n–6), when the transgenic yeast was incubated with the substrates 18:3n–3 and 18:2n–6, respectively. These results confirm the $\Delta 6$ enzymatic activity of the Eurasian perch FADS2. In addition, a comparison of the 18:2n–6 and 18:3n–3 desaturation rates seems to indicate a higher affinity of Eurasian perch FADS2 toward the n–3 substrate. Similar results were deduced from the functional characterization of *D. rerio* bifunctional FADS1/FADS2 (Hastings et al., 2001), and of the FADS2 from *O. mykiss*, *S. aurata*, *Psetta maxima* and *C. carpio* (Zheng et al., 2004). This higher affinity of FADS2 toward n–3 fatty acid substrates may be a consequence of the higher n–3 LC-PUFA requirements of carnivorous fish species as compared with those of the n–6 series (Xu et al., 2001; Xu and Kestemont, 2002; Regost et al., 2003; Geay et al., 2010). Functional characterization

of Eurasian perch FADS2 did not allow detecting tetracosahexaenoic acid (24:6n–3) when the tetracosapentaenoic acid (24:5n–3) substrate was added to the liquid medium. This absence of desaturation product may result in a lower enzymatic activity of the FADS2 toward the 24:5n–3 substrate, in comparison to the C₁₈ substrates.

Recently, it was shown that an alternative pathway to the “Sprecher pathway” involving an elongation and a desaturation step allows the production of EPA. Monroig et al. (2011, 2013) demonstrated the FADS2 implication in the $\Delta 8$ desaturation of eicosatrienoic acid (20:3n–3) into eicosatetraenoic acid (20:4n–3). As suggested by these authors, this alternative pathway seems to be more active in marine fish species such as meagre (*Argyrosomus regius*), cobia, gilthead sea bream and turbot than in freshwater species. This observation may explain the absence of 20:4n–3 product detected from Eurasian perch FADS2 when recombinant yeast was incubated with the 20:3n–3 substrate. In addition to this alternative pathway, a shorter pathway including a $\Delta 4$ desaturation reaction to convert 22:5n–3 into 22:6n–3 has been identified in FADS2 of the white-spotted spinefoot (Li et al., 2010), the Senegalese sole (Morais et al., 2012), the pike silverside (Fonseca-Madrigal et al., 2014) and the striped snakehead (Kuah et al., 2015). However, the $\Delta 4$ desaturation ability of the Eurasian perch FADS2 has not been analyzed in the present study and need further investigation.

Some of the fish FADS2 characterized so far display a low ability to desaturate 20:4n–3 and 20:3n–6 at the $\Delta 5$ position, with conversion rates from 0.2% in rainbow trout, sea bream or turbot (Zheng et al., 2004) to 2.3% in Atlantic salmon (Zheng et al., 2005) or cobia (Zheng et al., 2009). In our study, no $\Delta 5$ desaturase activity was recorded in transgenic yeasts containing the Eurasian perch FADS2 and incubated with the 20:4n–3 and 20:3n–6 substrates. Similar results were obtained from carnivorous fish species such as Atlantic cod (Tocher et al., 2006) and European sea bass (Santigosa et al., 2011). However, as described by Henrotte et al. (2011), [1-¹⁴C]20:5n–3 was detected when hepatocytes from Eurasian perch were incubated with the

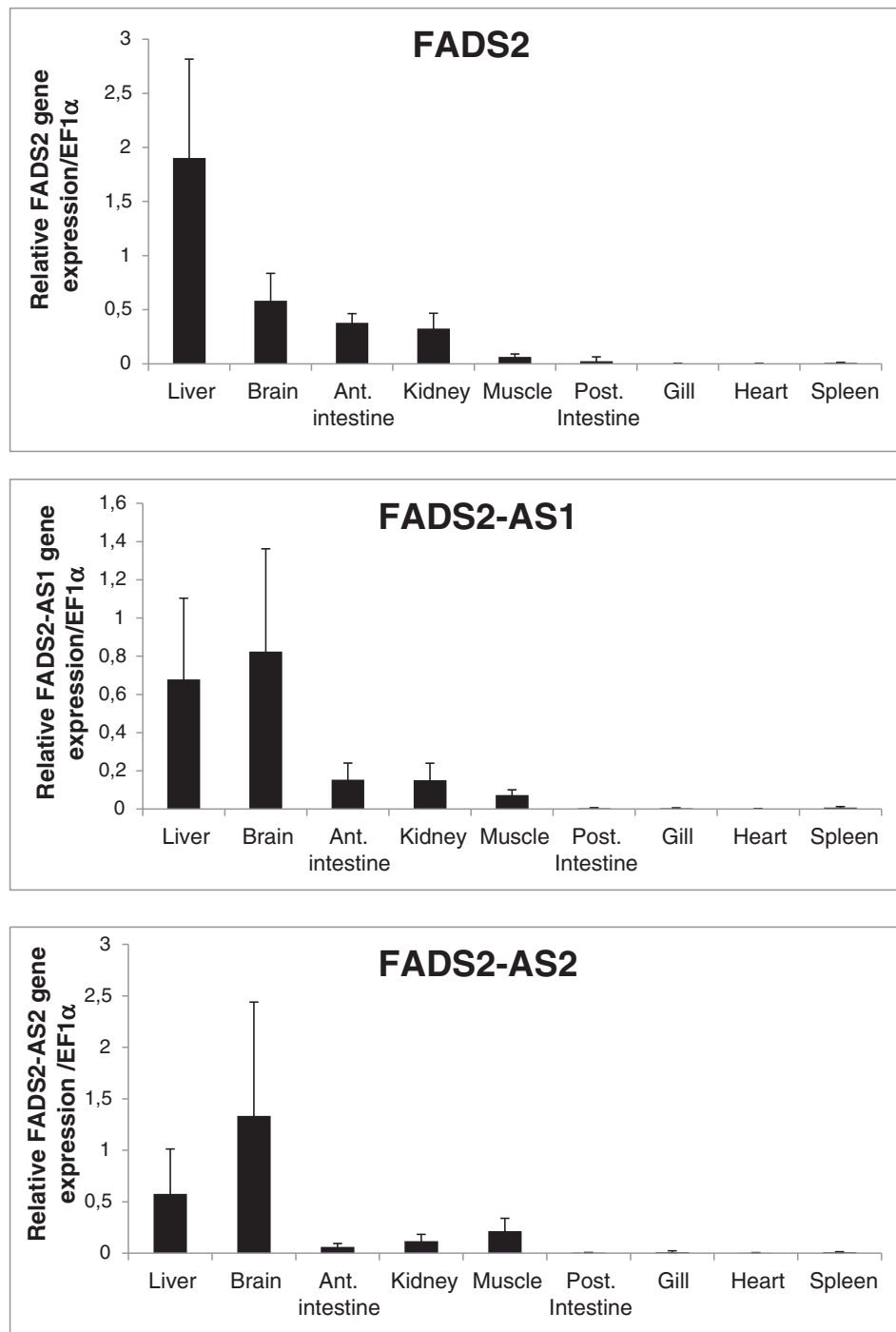


Fig. 5. Relative expression of *fads2*, *fads2-AS1*, and *fads2-AS2* in the liver, brain, anterior intestine, kidney, muscle, posterior intestine, gill, heart and spleen from Eurasian perch fed a fish based diet. Relative gene expression was determined by quantitative real-time RT-PCR after normalization with the expression of the EF1α housekeeping gene.

[1-¹⁴C]18:3n – 3 substrate, suggesting a Δ5 desaturation activity. This Δ5 enzymatic reaction may be carried out by a FADS2 protein encoded by another *fads2* gene, resulting from the genome duplication. Indeed, as explained by Castro et al. (2012), a loss of the *fads1* gene was observed in teleost fish and the existence of the Δ5 desaturation reaction in fish is mainly a consequence of independent mutations into *fads2* genes. For example, in Atlantic salmon, Δ5 activity is performed by a *fads2-like* gene, which has up to 95% amino acid homology with another *fads2* gene, resulting from salmonid-specific duplication. In the present work, the cloning of the PCR products obtained from the primers designed in the UTR regions allowed the identification of another putative *fads2* transcript encoding a protein of 445 amino acids

(Appendix A), with 96% amino acid homology with the functional Eurasian perch FADS2 described in this work. However, no desaturation products were detected in our experimental conditions when yeasts were transformed with this second *fads2* transcript and were incubated with 18:3n – 3, 18:3n – 6, 20:3n – 3, 20:4n – 3 and 24:5n – 3 substrates (not shown). In addition to these Eurasian perch *fads2* transcripts, two alternative splicing transcripts were identified in this study. Interestingly, the strong nucleotide homology of these alternative splicing transcripts with the putative Eurasian perch *fads2* transcript mentioned above may confirm this biological existence (Appendix B).

The retention of nucleotide sequences in inter-exons regions of the *fads2-AS1* and *fads2-AS2* did not make it possible to obtain functional

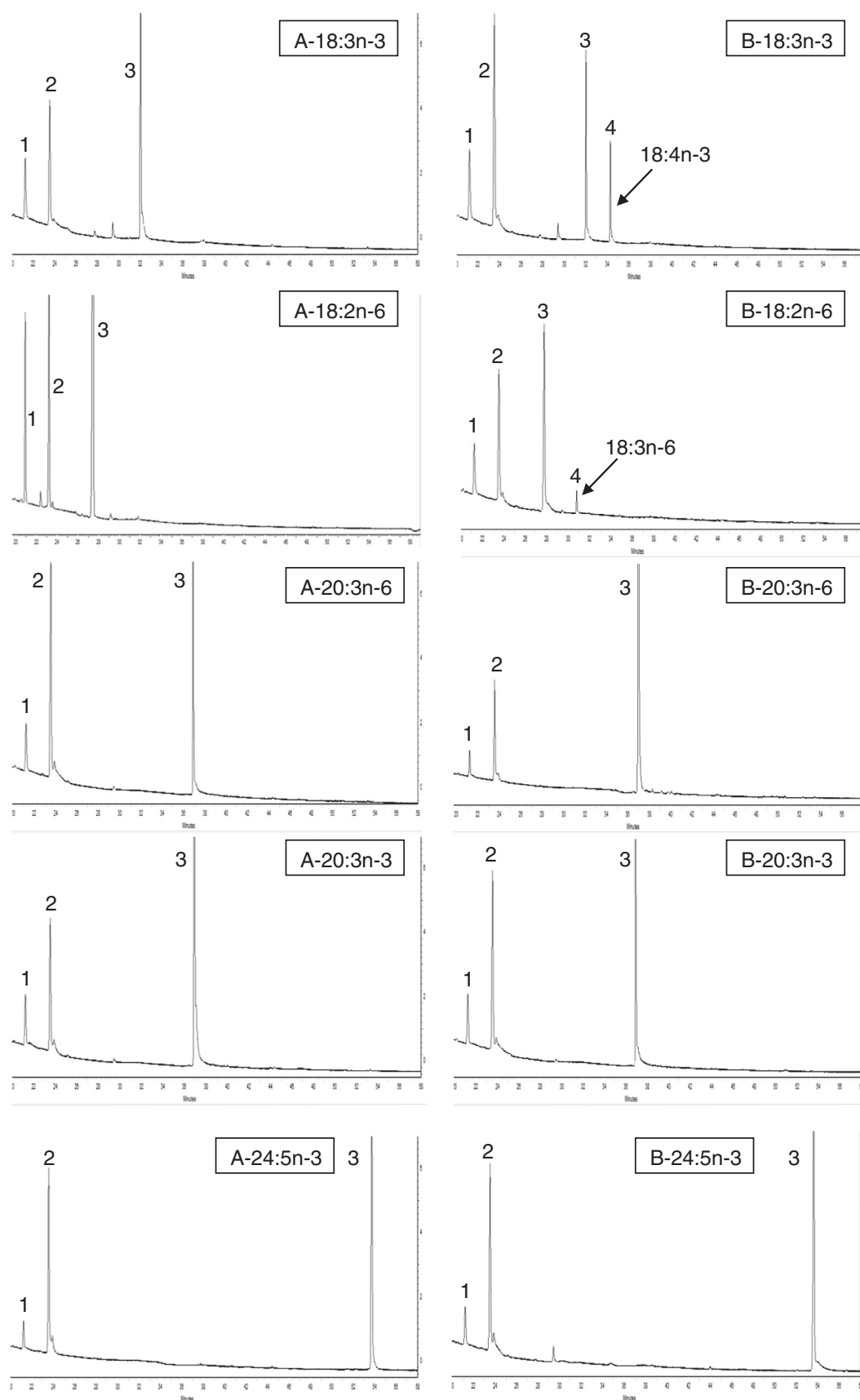


Fig. 6. Identification of fatty acid desaturation products in yeast transformed with pYES2 vector without insert (A) or containing the putative Eurasian perch *fads2* cDNA (B). The first two peaks in each graph are the endogenous 18:0 (1) and 18:1n-9 (with 18:1n-7 as shoulder) (2) fatty acids of *S. cerevisiae*. The next peak (3) in each panel is the exogenously added substrate fatty acid whereas the last peak (4) is the desaturated fatty acid product. The horizontal axis is the retention time.

Appendix B

Nucleotide alignment of the functional Eurasian perch *fads2* transcript described in this study with the other putative Eurasian perch

fads2 transcript and the *fads2-AS1* and *fads2-AS2* transcripts. Pairwise nucleotide comparison allowed the identification of the specific homology of some nucleotides between the putative Eurasian perch *fads2* and the *fads2-AS1* and *fads2-AS2* transcripts (indicated in shaded).

```

Funct. fads2      atgggaggtggaggccagctaaccggagccagaagagccgatcagcgggcgagctgctggt
Put. fads2      atgggaggtggaggccagctaaccggatgcagaagagccgatcagcgggcgggctgctggt
Fads2-AS1     atgggaggtggaggccagctaaccggatgcagaagagccgatcagcgggcgggctgctggt
Fads2-AS2     atgggaggtggaggccagctaaccggatgcagaagagccgatcagcgggcgggctgctggt
*****

Funct. fads2      gtctacacctgggaggaggtgcaaagccactgcaaccggaatgaccagtggctggtgata
Put. fads2      gtctacacctgggaggaggtgcagagccactgcaaccagaatgaccagtggctggtgata
Fads2-AS1     gtctacacctgggaggaggtgcaaagccactgcaaccagaatgaccagtggctggtgata
Fads2-AS2     gtctacacctgggaggaggtgcaaagccactgcaaccagaatgaccagtggctggtgata
*****

Funct. fads2      gatcgaaaggtttacaacatcacacagtggccaaaagacaccaggaggattcgagtc
Put. fads2      gatcgaaaggtttacaacatcacacagtggacaaaagacaccaggaggattcgagtc
Fads2-AS1     gatcgaaaggtttacaacatcacacagtggacaaaagacaccaggaggattcgagtc
Fads2-AS2     gatcgaaaggtttacaacatcacacagtggacaaaagacaccaggaggattcgagtc
*****

Funct. fads2      atcagccattatgctggagaggaatgccacggaggcattcactgcttttcatccagattta
Put. fads2      atcagccattatgctggagaggaatgccacggaggcattcactgcttttcatccagattta
Fads2-AS1     atcagccattatgctggagaggaatgccacggaggcattcactgcttttcatccagattta
Fads2-AS2     atcagccattatgctggagaggaatgccacggaggcattcactgcttttcatccagattta
*****

Funct. fads2      aagtttgtgaaaaagtttctgaagccgctgcagattggagagctggcagcgacagagccc
Put. fads2      aagtttgtgaaaaagtttctgaagccgctgcagattggagagctggcagcgacggagccc
Fads2-AS1     aagtttgtgaaaaagtttctgaagccgctgcagattggagagctggcagcgacggagccc
FADS3         aagtttgtgaaaaagtttctgaagccgctgcagattggagagctggcagcgacggagccc
*****

Funct. fads2      agccaggaccgaaacaaaaatgcaaccatcatacaggatttccatactttacgtgctcag
Put. fads2      agccaggaccgaaacaaaaatgcaaccatcatacaggatttccatactttacgtgctcag
Fads2-AS1     agccaggaccgaaacaaaaatgcaaccatcatacaggatttccatactttacgtgctcag
Fads2-AS2     agccaggaccgaaacaaaaatgcaaccatcatacaggatttccatactttacgtgctcag
*****

Funct. fads2      gtggagagcgagggtctgtttcgagctcgcccttgttcttctgctccacctgggtcac
Put. fads2      gtggagagcgagggtctgtttcgagctcgcccttgttcttctgctccacctgggtcac
Fads2-AS1     gtggagagcgagggtctgtttcgagctcgcccttgttcttctgctccacctgggtcac
Fads2-AS2     gtggagagcgagggtctgtttcgagctcgcccttgttcttctgctccacctgggtcac
*****

Funct. fads2      atccttctgctggaggccctcgctggctgatcatctgggtctggggaactagctggact
Put. fads2      atccttctgctggaggccctcgctggctgatcatctgggtctggggaactagctggact
Fads2-AS1     atccttctgctggaggccctcgctggctgatcatctgggtctggggaactagctggact
Fads2-AS2     atccttctgctggaggccctcgctggctgatcatctgggtctggggaactagctggact
*****

Funct. fads2      ctgacctttctgagcgccatcatattagcaaccctc-----agttgca
Put. fads2      ctgacctttctgagcgccatcatgctagcaaccgctc-----agttgca
Fads2-AS1     ctgacctttctgagcgccatcatgctagcaaccgctcaggtgattcgaacatcattatct
Fads2-AS2     ctgacctttctgagcgccatcatgctagcaaccgctc-----agttgca
*****

Funct. fads2      -----agttgca
Put. fads2      -----agttgca
Fads2-AS1     gttattgtgttgacgaactgtaagtcaatgccgggtttctcttcatcttctgtagttgca
Fads2-AS2     -----agttgca
*****

Funct. fads2      ggctggatggctgcagcatgactttggccacctgtctgtcttcaagaagtccagctggaa
Put. fads2      ggctggatggctgcagcatgactttggccacctgtctgtcttcaagaagtccagctggaa
Fads2-AS1     ggctggatggctgcagcatgactttggccacctgtctgtcttcaagaagtccagctggaa
Fads2-AS2     ggctggatggctgcagcatgactttggccacctgtctgtcttcaagaagtccagctggaa
*****

Funct. fads2      tcacttgttgacaaagtttgcatttggtcatttgaaggagcgctctgccaactggtggaa
Put. fads2      tcacttgttgacaaagtttgcatttggtcatttgaaggagcgctctgccaactggtggaa
Fads2-AS1     tcacttgttgacaaagtttgcatttggtcatttgaaggagcgctctgccaactggtggaa
Fads2-AS2     tcacttgttgacaaagtttgcatttggtcatttgaaggagcgctctgccaactggtggaa
*****

Funct. fads2      tcaccggcatttccagcatcacgctaaccacaacatcttcagtaaggaccctgatgtcaa
Put. fads2      tcaccggcatttccagcatcacgctaaccacaacatcttcagtaaggaccctgatgtcaa
Fads2-AS1     tcaccggcatttccagcatcacgctaaccacaacatcttcagtaaggaccctgatgtcaa
Fads2-AS2     tcaccggcatttccagcatcacgctaaccacaacatcttcagtaaggaccctgatgtcaa
*****

```

```

Funct. fads2      catgttgcacgtctttgtagttggagaaactcaaccagtgaggatggtacataaaaaagat
Put.   fads2      catgttgcacatcttcgtagttggagagactcaaccagtgaggatggtacataaaaaagat
Fads2-AS1       catgttgcacatcttcgtagttggagaaactcaaccagtgaggatggtacataaaaaagat
Fads2-AS2       catgttgcacatcttcgtagttggagaaactcaaccagtgaggatggtacataaaaaagat
*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

Funct. fads2      caaatatatgccttatcaccaccaacacaagttcttcttctcg-----
Put.   fads2      caaatatatgccttatcaccaccaacacaagttcttcttctcg-----
Fads2-AS1       caaatatatgccttatcaccaccaacacaagttcttcttctcg-----
Fads2-AS2       caaatatatgccttatcaccaccaacacaagttcttcttctcggtatgtttcttggact
*****

Funct. fads2      -----
Put.   fads2      -----
Fads2-AS1       -----
Fads2-AS2       catttaaaatagtgcactatgaaaacttcgcaggataattgttttcttctcctctt

Funct. fads2      ---ttggccaccgcttctcattccagtttacttccacattcaataatacacaccatga
Put.   fads2      ---ttggaccacgcttctcattccagtttcttccacattcaataatgcaaaccatga
Fads2-AS1       ---ttggaccacgcttctcattccagtttcttccacattcaataatgcaaaccatga
Fads2-AS2       taattggaccacgcttctcattccagtttcttccacattcaataatgcaaaccatga
*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

Funct. fads2      ttcccgcgcgactgggtggatctggcttggcttcttcttactactctgcgtacctgt
Put.   fads2      ttcccgcgcgtcagtggtggatctggcttggcttcttcttactactctgcgtacctgt
Fads2-AS1       ttcccgcgcgtcagtggtggatctggcttggcttcttcttactactctgcgtacctgt
Fads2-AS2       ttcccgcgcgtcagtggtggatctggcttggcttcttcttactactctgcgtacctgt
*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

Funct. fads2      gctgttctatacccatgtttggcctgtttggctcagtggtgtttatcagcttcatcaggt
Put.   fads2      gctgttctatacccatgtttggcctgtttggctcagtggtgtttatcagcttcatcagga
Fads2-AS1       gctgttctatacccatgtttggcctgtttggctcagtggtgtttatcagcttcatcaggt
Fads2-AS2       gctgttctatacccatgtttggcctgtttggctcagtggtgtttatcagcttcatcagga
*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

Funct. fads2      ttttgagagtcacgggtttgtgtgggtgactcagatgagtcacatctgccatggacatcg
Put.   fads2      ttttgagagtcacgggtttgtgtgggtgactcagatgagtcacatctgccatggacatcg
Fads2-AS1       ttttgagagtcacgggtttgtgtgggtgactcagatgagtcacatctgccatggacatcg
Fads2-AS2       ttttgagagtcacgggtttgtgtgggtgactcagatgagtcacatctgccatggacatcg
*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

Funct. fads2      accacgagaagaaccaggactggctgtccatgcagttacaagccacctgtaacataaagc
Put.   fads2      accacgagaagaaccaggactggctgtccatgcagttacaagccacctgtaacataaagc
Fads2-AS1       accacgagaagaaccaggactggctgtccatgcagttacaagccacctgtaacataaagc
Fads2-AS2       accacgagaagaaccaggactggctgtccatgcagttacaagccacctgtaacataaagc
*****

Funct. fads2      agtccctcttcaacgactggttcagcggacacctcaactttcaaatcgaacaccatttgt
Put.   fads2      agtccctcttcaacgactggttcagcggacacctcaactttcaaatcgaacaccatttgt
Fads2-AS1       agtccctcttcaacgactggttcagcggacacctcaactttcaaatcgaacaccatttgt
Fads2-AS2       agtccctcttcaacgactggttcagcggacacctcaactttcaaatcgaacaccatttgt
**.*.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

Funct. fads2      ttccaacaatgccgcgccacaactaccacctggtggccccgctggtccgtgcaactgtgtg
Put.   fads2      ttccaacaatgccgcgccacaactaccacctggtggccccgctggtccgtgcaactgtgtg
Fads2-AS1       ttccaacaatgccgcgccacaactaccacctggtggccccgctggtccgtgcaactgtgtg
Fads2-AS2       ttccaacaatgccgcgccacaactaccacctggtggccccgctggtccgtgcaactgtgtg
*****

Funct. fads2      agaaacatggggttccttaccaggtgaaaacattgtggcagggttcgctgatgttttca
Put.   fads2      agaaacatggggttccttaccaggtgaaaacattgtggcagggttcgctgatgttttca
Fads2-AS1       agaaacatggggttccttaccaggtgaaaacattgtggcagggttcgctgatgttttca
Fads2-AS2       agaaacatggggttccttaccaggtgaaaacattgtggcagggttcgctgatgttttca
*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****.*****

Funct. fads2      ggtcactgaacactcaggcgacctctggttgatgcataatctgcataaatga
Put.   fads2      ggtcactgaacactcaggcgacctctggttgatgcataatctgcataaatga
Fads2-AS1       ggtcactgaacactcaggcgacctctggttgatgcataatctgcataaatga
Fads2-AS2       ggtcactgaacactcaggcgacctctggttgatgcataatctgcataaatga
*****

```

References

- Castro, L.F.C., Monroig, O., Leaver, M.J., Wilson, J., Cunha, I., Tocher, D.R., 2012. Functional desaturase *Fads1* ($\Delta 5$) and *Fads2* ($\Delta 6$) orthologues evolved before the origin of jawed vertebrates. *PLoS ONE* 7, e31950.
- Cook, H.W., 1996. Fatty Acid Desaturation and Chain Elongation in Eukaryote. Elsevier, Amsterdam.
- Fernandes, G., Venkatraman, J.T., 1993. Role of omega-3 fatty acids in health and disease. *Nutr. Res.* 13, 19–45.
- Fonseca-Madrigal, J., Navarro, J.C., Hontoria, F., Tocher, D.R., Martínez-Palacios, C.A., Monroig, Ó., 2014. Diversification of substrate specificities in teleostei *Fads2*: characterization of $\Delta 4$ and $\Delta 6\Delta 5$ desaturases of *Chirostoma estor*. *J. Lipid Res.* 55, 1408–1419.
- Francis, D.S., Turchini, G.M., Jones, P.L., De Silva, S.S., 2007. Dietary lipid source modulates in vivo fatty acid metabolism in the freshwater fish, Murray cod (*Maccullochella peelii peelii*). *J. Agric. Food Chem.* 55, 1582–1591.
- Geay, F., Santigosa, I., Culi, E., Corporeau, C., Boudry, P., Dreano, Y., Corcos, L., Bodin, N., Vandeputte, M., Zambonino-Infante, J.L., Mazurais, D., Cahu, C.L., 2010. Regulation of *FADS2* expression and activity in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) fed a vegetable diet. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 156, 237–243.
- González-Rovira, A., Mourente, G., Zheng, X., Tocher, D.R., Pendón, C., 2009. Molecular and functional characterization and expression analysis of a $\Delta 6$ fatty acyl

- desaturase cDNA of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* 298, 90–100.
- Hashimoto, K., Yoshizawa, A.C., Okuda, S., Kuma, K., Goto, S., Kanehisa, M., 2008. The repertoire of desaturases and elongases reveals fatty acid variations in 56 eukaryotic genomes. *J. Lipid Res.* 49, 183–191.
- Hastings, N., Agaba, M., Tocher, D.R., Leaver, M.J., Dick, J.R., Sargent, J.R., Teale, A.J., 2001. A vertebrate fatty acid desaturase with $\Delta 5$ and $\Delta 6$ activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 14304–14309.
- Hastings, N., Agaba, M.K., Tocher, D.R., Zheng, X., Dickson, C.A., Dick, J.R., Teale, A.J., 2004. Molecular cloning and functional characterization of fatty acyl desaturase and elongase cDNAs involved in the production of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from α -linolenic acid in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Mar. Biotechnol.* 6, 463–474.
- Henderson, R.J., Park, M.T., Sargent, J.R., 1995. The desaturation and elongation of ^{14}C -labelled polyunsaturated fatty acids by pike (*Esox lucius* L.) in vivo. *Fish Physiol. Biochem.* 14, 223–235.
- Henrotte, E., Kpogue, D., Mandiki, S.N.M., Wang, N., Douxfils, J., Dick, J., Tocher, D., Kestemont, P., 2011. n-3 and n-6 fatty acid bioconversion abilities in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) at two developmental stages. *Aquac. Nutr.* 17, 216–225.
- Kestemont, P., Dabrowski, D., 1996. Recent advances in the aquaculture of percid fish. *J. Appl. Ichthyol.* 12, 137–200.
- Kuah, M.-K., Jaya-Ram, A., Shu-Chien, A.C., 2015. The capacity for long-chain polyunsaturated fatty acid synthesis in a carnivorous vertebrate: functional characterisation and nutritional regulation of a Fads2 fatty acyl desaturase with $\Delta 4$ activity and an Elovl5 elongase in striped snakehead (*Channa striata*). *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids* 1851, 248–260.
- Li, Y.Y., Hu, C.B., Zheng, Y.J., Xia, X.A., Xu, W.J., Wang, S.Q., Chen, W.Z., Sun, Z.W., Huang, J.H., 2008. The effects of dietary fatty acids on liver fatty acid composition and $\Delta 6$ -desaturase expression differ with ambient salinities in *Siganus canaliculatus*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 151, 183–190.
- Li, Y., Monroig, O., Zhang, L., Wang, S., Zheng, X., Dick, J.R., You, C., Tocher, D.R., 2010. Vertebrate fatty acyl desaturase with $\Delta 4$ activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 16840–16845.
- Lu, J., Peatman, E., Wang, W., Yang, Q., Abernathy, J., Wang, S., Kucuktas, H., Liu, Z., 2010. Alternative splicing in teleost fish genomes: same-species and cross-species analysis and comparisons. *Mol. Genet. Genomics* 283, 531–539.
- Monroig, O., Li, Y., Tocher, D.R., 2011. Delta-8 desaturation activity varies among fatty acyl desaturases of teleost fish: high activity in delta-6 desaturases of marine species. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 159, 206–213.
- Monroig, O., Zheng, X.Z., Morais, S., Leaver, M.J., Taggart, J.B., Tocher, D.R., 2010. Multiple genes for functional Delta 6 fatty acyl desaturases (Fad) in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): Gene and cDNA characterization, functional expression, tissue distribution and nutritional regulation. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids* 1801, 1072–1081.
- Monroig, O., Tocher, D.R., Hontoria, F., Navarro, J.C., 2013. Functional characterisation of a Fads2 fatty acyl desaturase with $\Delta 6/\Delta 8$ activity and an Elovl5 with C16, C18 and C20 elongase activity in the anadromous teleost meagre (*Argyrosomus regius*). *Aquaculture* 412, 14–22.
- Morais, S., Castanheira, F., Martinez-Rubio, L., Conceição, L.E., Tocher, D.R., 2012. Long chain polyunsaturated fatty acid synthesis in a marine vertebrate: ontogenetic and nutritional regulation of a fatty acyl desaturase with $\Delta 4$ activity. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Biol. Lipids* 1821, 660–671.
- Regost, C., Arzel, J., Robin, J., Rosenlund, G., Kaushik, S.J., 2003. Total replacement of fish oil by soybean or linseed oil with a return to fish oil in turbot (*Psetta maxima*) — 1. Growth performance, flesh fatty acid profile, and lipid metabolism. *Aquaculture* 217, 465–482.
- Ren, H.-t., Yu, J.-h., Xu, P., Tang, Y.-k., 2012. Influence of dietary fatty acids on muscle fatty acid composition and expression levels of $\Delta 6$ desaturase-like and Elovl5-like elongase in common carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 163, 184–192.
- Ruiz-Lopez, N., Usher, S., Sayanova, O.V., Napier, J.A., Haslam, R.P., 2015. Modifying the lipid content and composition of plant seeds: engineering the production of LC-PUFA. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 143–154.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method. A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425.
- Santigosa, E., Geay, F., Tonon, T., Le Delliou, H., Kuhl, H., Reinhardt, R., Corcos, L., Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L., Mazurais, D., 2011. Cloning, tissue expression analysis, and functional characterization of two $\Delta 6$ -desaturase variants of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Mar. Biotechnol.* 13, 22–31.
- Schneider, A.-C., Beguin, P., Bourez, S., Perfield II, J.W., Mignolet, E., Debier, C., Schneider, Y.-J., Larondelle, Y., 2012. Conversion of t11t13 CLA into c9t11 CLA in Caco-2 cells and inhibition by sterculic oil. *PLoS ONE* 7, e32824.
- Seiliez, I., Panserat, S., Kaushik, S., Bergot, P., 2001. Cloning, tissue distribution and nutritional regulation of a Delta 6-desaturase-like enzyme in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 130, 83–93.
- Shanklin, J., Whittle, E., Fox, B.G., 1994. Eight histidine residues are catalytically essential in a membrane-associated iron enzyme, stearoyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase. *Biochemistry* 33, 12787–12794.
- Sprecher, H., Luthria, D.L., Mohammed, B.S., Baykousheva, S.P., 1995. Reevaluation of the pathways for the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. *J. Lipid Res.* 36, 2471–2477.
- Stukey, J.E., McDonough, V.M., Martin, C.E., 1990. The OLE1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the delta 9 fatty acid desaturase and can be functionally replaced by the rat stearoyl-CoA desaturase gene. *J. Biol. Chem.* 265, 20144–20149.
- Tanomman, S., Ketudat-Cairns, M., Jangprai, A., Boonanutanasarn, S., 2013. Characterization of fatty acid delta-6 desaturase gene in Nile tilapia and heterogenous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 166, 148–156.
- Tocher, D.R., 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Fish. Sci.* 11, 107–184.
- Tocher, D.R., Zheng, X., Schlechtriem, C., Hastings, N., Dick, J.R., Teale, A.J., 2006. Highly unsaturated fatty acid synthesis in marine fish: cloning, functional characterization, and nutritional regulation of fatty acyl $\Delta 6$ desaturase of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Lipids* 41, 1003–1016.
- Xie, D., Chen, F., Lin, S., Wang, S., You, C., Monroig, O., Tocher, D.R., Li, Y., 2014. Cloning, functional characterization and nutritional regulation of $\Delta 6$ Fatty acyl desaturase in the herbivorous euryhaline teleost *Scatophagus argus*. *PLoS ONE* 9, e90200.
- Xu, X., Kestemont, P., 2002. Lipid metabolism and FA composition in tissues of Eurasian perch *Perca fluviatilis* as influenced by dietary fats. *Lipids* 37, 297–304.
- Xu, X., Fontaine, P., Méléard, C., Kestemont, P., 2001. Effects of dietary fat levels on growth, feed efficiency and biochemical compositions of Eurasian perch *Perca fluviatilis*. *Aquac. Int.* 9, 437–449.
- Yamamoto, Y., Kabeya, N., Takeuchi, Y., Haga, Y., Satoh, S., Takeuchi, T., Yoshizaki, G., 2010. Cloning and nutritional regulation of polyunsaturated fatty acid desaturase and elongase of a marine teleost, the nibe croaker *Nibea mitsukurii*. *Fish. Sci.* 76, 463–472.
- Zheng, X., Seiliez, I., Hastings, N., Tocher, D.R., Panserat, S., Dickson, C.A., Bergot, P., Teale, A.J., 2004. Characterization and comparison of fatty acyl $\Delta 6$ -desaturase cDNAs from freshwater and marine teleost fish species. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 139, 269–279.
- Zheng, X., Tocher, D.R., Dickson, C.A., Bell, J.G., Teale, A.J., 2005. Highly unsaturated fatty acid synthesis in vertebrates: new insights with the cloning and characterization of a $\Delta 6$ desaturase of Atlantic salmon. *Lipids* 40, 13–24.
- Zheng, X., King, Z., Xu, Y., Monrig, O., Morais, S., Tocher, D.R., 2009. Physiological roles of fatty acyl desaturases and elongases in marine fish: characterisation of cDNAs of fatty acyl $\Delta 6$ -desaturase and elovl5 elongase of cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture* 290, 122–131.



Molecular cloning and 3D model of a fatty-acid elongase in a carnivorous freshwater teleost, the European perch (*Perca fluviatilis*)

Emmanuel Tinti^{1,2} · Florian Geay³ · Maximilien Lopes Rodrigues^{1,5} · Patrick Kestemont^{2,4} · Eric A. Perpète^{1,2,5} · Catherine Michaux^{1,5,6}

Received: 14 March 2019 / Accepted: 20 May 2019
© King Abdulaziz City for Science and Technology 2019

Abstract

The European perch (*Perca fluviatilis*) is a carnivorous freshwater fish able to metabolise polyunsaturated fatty acids (PUFA) into highly unsaturated fatty acids (HUFA). This makes it a potential candidate for sustainable aquaculture development. In this study, special attention is given to the fatty-acid elongase (ELOVL) family, one of the two enzymatic systems implied in the HUFA biosynthesis. Structural information on European perch enzyme converting PUFA into HUFA is obtained by both molecular cloning and in silico characterization of an ELOVL5-like elongase from *P. fluviatilis* (*pfELOVL*). The full-length cDNA sequence consists of a 885-base pair Open Reading Frame coding for a 294-amino acid protein. Phylogenetic analysis and sequence alignment with fish elongases predict the *pfELOVL* clusters within the ELOVL5 sub-group. The amino-acid sequence displays the typical ELOVL features: several transmembrane α helices (TMH), an endoplasmic reticulum (ER) retention signal, and four “conserved boxes” involved in the catalytic site. In addition, the topology analysis predicts a 7-TMH structure addressed in the ER membrane. A 3D model of the protein embedded in an ER-like membrane environment is also provided using de novo modelling and molecular dynamics. From docking studies, two putative enzyme–substrate-binding modes, including H bonds and CH– π interactions, emphasize the role of specific residues in the “conserved boxes”.

Keywords Cloning · Fatty-acid elongase · HUFA · Modelling · *Perca fluviatilis*

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s13205-019-1773-x>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Catherine Michaux
catherine.michaux@unamur.be

¹ Laboratoire de Chimie Physique des Biomolécules, UCPTS, University of Namur, 61 rue de Bruxelles, 5000 Namur, Belgium

² Institute of Life-Earth-Environment, University of Namur, Namur, Belgium

³ BioMar AS, 7 Havnegata, 7010 Trondheim, Norway

⁴ Research Unit in Environmental and Evolutionary Biology, University of Namur, 61 rue de Bruxelles, 5000 Namur, Belgium

⁵ Namur Institute of Structures Matter, University of Namur, Namur, Belgium

⁶ Namur Research Institute for Life Sciences, University of Namur, Namur, Belgium

Introduction

One of the major challenges of future society will be the population supplying of food resources. In this context, aquaculture has been developed to offset the increase in water products demand (D’Odorico et al. 2014), supplying almost half of halieutic products intended for human diet (Godfray et al. 2010).

As the principal products of aquaculture, fish are the major dietary sources of highly unsaturated fatty acids (HUFA) for humans, especially for the n-3 HUFA series, such as eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5n-3) and docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3) (Strobel et al. 2012). These FA, with the n-6 series arachidonic acid (ARA, 20:4n-6), are essential fatty acids (EFA) for fish as well as for humans and mammals in general (Tocher 2015). EFA also have particularly important roles in cellular and physiological processes (Walls et al. 2016; Yeagle 2014). Moreover, ARA, EPA, and DHA are eicosanoids precursors, implicated in practically every organ, tissue, and cell, which explains

the very diversified physiological roles of EFA (Calder 2014). Particularly, essential HUFA are involved in immune response (Russell and Bürgin-Maunders 2012), and balance between them can improve or impair resistance against pathogens, cause cardiac diseases, inflammatory, or autoimmune disorders (Nayak et al. 2017; Geay et al. 2015a).

Up to now, the main n-3 HUFA source in fish food is fish oil (FO), coming from small marine species such as anchovies and sardines (Graziano da Silva 2014). This practice greatly forces the continuing growth of aquaculture activities (Tacon et al. 2012). However, alternatives do exist, such as vegetable oils (VO) (Tocher 2015). Unlike FO, VO lack HUFA but are rich in their C18 polyunsaturated fatty-acid (PUFA) precursors: linoleic acid (LA, 18:2n-6) and α -linolenic acid (ALA, 18:3n-3), respectively, for the n-6 and n-3 series (Lenihan-Geels et al. 2013).

The capacity of fish to synthesize HUFA from PUFA varies among species. Indeed, freshwater fish, mainly herbivorous or omnivorous, can produce DHA from ALA, and ARA from LA. In contrast, the mostly carnivorous marine species are unable to convert C18 into C20 and C22 at a physiologically significant rate, either because of a repression of enzymatic stakeholders or because of their absence, depending on regarded species (Tocher 2015; Geay et al. 2015b). The enzymes converting PUFA into HUFA are members of fatty-acid desaturases and very long-chain fatty-acid elongases (ELOVL) families. In fish, two desaturases and three elongases are involved in the PUFA/HUFA metabolism (Monroig et al. 2013a; Xue et al. 2014).

European perch (*Perca fluviatilis* L., 1758) is a carnivorous freshwater species, widely distributed in Eurasia. Although belonging to a nearly exclusively marine order (Perciformes), its capacity to synthesize HUFA from PUFA, especially n-3 series (Henrotte et al. 2011), points it out as a potential candidate for a sustainable aquaculture development and diversification, regarding the consumer dietary preference for carnivorous species (Steenfeldt et al. 2015). However, few is known about the molecular fundamentals of the HUFA synthesis pathway in this fish species. While we have already partially characterized its $\Delta 6$ fatty-acid desaturase (Geay et al. 2016), no investigation on elongase enzymes was performed. In that context, we here have focused on the molecular cloning and in silico characterization of an ELOVL from *P. fluviatilis* (*pfELOVL*) to have the first structural information on a European perch enzyme converting PUFA into HUFA. Currently, the Protein Data Bank (PDB) does not contain any 3D structure of ELOVL and very few studies were dedicated to their structural features (Denic and Weissman 2007; Hernandez-Buquer and Blacklock 2013; Vrinten et al. 2010; Logan et al. 2014; Nayak et al. 2018).

Over the past decade, ELOVL2, -4 and -5, membrane enzymes of the endoplasmic reticulum (ER) have been

sequenced in various freshwater (Kuah et al. 2015; Fonseca-Madrugal et al. 2014; Ren et al. 2012; Monroig et al. 2010; Tan et al. 2010; Gregory and James 2014), marine (Monroig et al. 2011a; Morais et al. 2011, 2012), anadromous (Monroig et al. 2013b; Gregory and James 2014; Carmona-Antoñanzas et al. 2011, 2013; Morais et al. 2009), and catadromous species (Wang et al. 2014; Mohd-Yusof et al. 2010; Tu et al. 2012a). Alignments of these sequences allow to highlight their general features and conserved motifs putatively involved in the catalytic site: several (from 5 to 7) transmembrane α helices (TMH), one ER retention signal in the C-terminal region, and four conserved boxes (KEDT-, His-, Tyr-, Gln-box) (Monroig et al. 2016). The importance of these amino acids is supported by several site-directed mutagenesis studies and chimeric protein construction experiments in unicellular eukaryotes (Denic and Weissman 2007; Hernandez-Buquer and Blacklock 2013; Vrinten et al. 2010; Logan et al. 2014; Kihara 2012; Blacklock et al. 2008). In vertebrates, ELOVL shows a weak substrate specificity without discrimination based on length or double-bond number (Kihara 2012). ELOVL2 shows a preference towards C20n-3 and C22n-3, while ELOVL5 prefers C18n-3 and C20n-3. ELOVL4 is present in a limited number of tissues and shows an exclusive activity towards C22n-3 HUFA (Gregory and James 2014).

In this contribution, we perform (1) a consensus analysis of the topology, (2) a sequence and phylogenetic analysis for *pfELOVL5*-like elongase, and we predict (3) its 3D structure embedded in a native-like membrane environment, highlighting the conserved motifs, a potential active site, and two putative substrate-binding modes.

Materials and methods

Isolation and cloning of the ELOVL cDNA

All animal-handling procedures were approved by the local ethics committee for animal research of the University of Namur. Total RNA was extracted from adult individual liver using the InnuSPEED Tissue RNA© kit (Analytik Jena) and reverse-transcribed with the RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas). Degenerated and specific primers were designed from available fish elongase sequences on NCBI database (NLM–NIH) and used to perform degenerated, 5'/3'-RACE and full-length PCR. Amplicons were obtained using Advantage® cDNA PCR kit (Clontech). Each cDNA product was purified by the High-Pure PCR Product Purification kit (Roche Applied Science) and cloned in *E. coli* NovaBlue competent cell strain (Clonables™ Kit, Novagen) with the pGEM®-T Easy Vector System I (Promega).

Purification of plasmid vector was performed using Gen-Elute™ Five-Minute Plasmid Miniprep Kit® (Sigma). Sequencing was achieved by MacroGen Inc.

Sequence analysis and 2D-structural patterns

The *p/ELOVL* primary structure was translated with the ExPASy Translate tool (Swiss Institute of Bioinformatics, Swiss). For comparative analyses, amino-acid sequences were aligned by MAFFT (CBRC-AIST, Japan) using BLOSUM matrix to assess identity and similarity, while phylogeny was predicted with the neighbour-joining method (Saitou and Nei 1987) and constructed by MEGA5 (Arizona State University, USA).

The proportion of secondary structures was estimated by the NPS@ secondary structure prediction tool (Université Lyon I—Claude Bernard, France). The putative presence of TMH was checked by hydropathy profiles produced by 15 programs: DAS (Research Institute of Molecular Pathology, Austria), ExPASy TMPred tool, HMMTOP (Hungarian Academy of Sciences, Hungary), OCTOPUS (Stockholm University, Sweden), NPS@ PHDhtm tool, Philius (University of Washington, USA), Phobius (Stockholm Bioinformatics Center, Sweden), PolyPhobius (Stockholm Bioinformatics Center), SCAMPI (Stockholm Bioinformatics Center), SOSUI (Nagahama Institute of Bio-Science and Technology, Japan), SPLIT 4.0 (University of Split, Croatia), SPOCTOPUS (Stockholm Bioinformatics Center), TM-Finder (Toronto University, Canada), TMHMM (Technical University of Denmark, Denmark), TopPred (Université Paris VII—Diderot, France). Hydropathy profiles were also exploited to predict the membrane orientation of N- and C-terminal extremities and soluble segments.

3D-structure prediction

Two strategies were selected to predict the 3D structure of the *p/ELOVL*: the fold recognition and the de novo methods. RaptorX (University of Chicago, USA) managed the fold recognition, whereas the Rosetta@home suite (University of Washington, USA) was operated to realise de novo modelling. The required inputs were obtained from experience (protein sequence), Robetta (fragment library), OCTOPUS (hydropathy profile), and Rosetta@home (lipophilicity profile). The 3D models were generated with the “Membrane-initio2” protocol. Ramachandran plots were drawn with RAMPAGE (University of Cambridge, UK). All output files were viewed with MacPyMOL (Schrödinger Inc., USA) or Visual Molecular Dynamics (VMD) (University of Illinois, USA).

Molecular dynamics

The lipid membrane environment was built with the CHARMM-GUI program (Lee et al. 2016). Molecular dynamics (MD) simulations were performed thanks to GROMACS 5.0.2 program (Abraham et al. 2015; Berendsen et al. 1995). The simulation systems consist of cubic boxes of $10 \times 12 \times 12$ nm. Water thickness was set to 1.7 nm on both sides, which makes approximately 40,000 water molecules in total. Bilayers consist of 172 1-stearoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-phosphocholine (SLPC). The three-site water model TIP3P was chosen to describe the solvent, and periodic boundary conditions were applied in all directions. Eleven chloride anions were randomly placed to neutralize the positive charge of the protein. The selected force field is charmm36 (Huang and Mackerell 2013) and additional parameters for lipids were taken from CHARMM-GUI. H bonds were constrained using the linear constraint solver (LINCS) algorithm (Hess et al. 1997). The Verlet cut-off scheme was set to 1.2 nm for pair interactions and the cut-off distance for Van der Waals and electrostatic interactions was also set to 1.2 nm. The electrostatic interactions were described via the particle-mesh Ewald (PME) method with a grid spacing of 1.0 Å (Essmann et al. 1995). The energy minimization step used the steepest descent method. The systems were equilibrated to relax the uncorrelated initial configurations. A first equilibration was performed in the NVT ensemble for 0.5 ns with protein coordinates fixed and a second one in the NPAT ensemble for 0.325 ns without restraints. Production simulations ran for 210 ns in the NPT ensemble with a time step of 2 fs, with protein, lipids, ions, and water independently coupled with a Nosé–Hoover thermostat. Temperature was set at 298 K. Pressure was kept constant to 1 atm by the semi-isotropic Parrinello–Rahman pressure coupling algorithm (Parrinello and Rahman 1981). The results were analyzed by integrated GROMACS functions and by VMD (Humphrey et al. 1996). The secondary structure analysis was done using the DSSP algorithm (Kabsch and Sander 1983).

Molecular docking

The docking between our model and its substrate was performed with the GOLD suite of programs (Cambridge Crystallographic Data Centre, UK). The binding region was defined as a 10 Å radius sphere centered on Lys120. The following amino acids were defined as being part of the catalytic site (belonging to the 4 conserved boxes): K¹²⁰, E¹²³, T¹²⁷ (from KEDT-box), H¹⁴⁶, H¹⁴⁷ (from His-box), N¹⁷³, H¹⁷⁷, M¹⁸⁰, Y¹⁸¹, Y¹⁸³ (from Tyr-box), T²⁰³ (from Gln-box). γ -linolenic acid (GLA) and ARA were chosen as substrates. For the 20-genetic algorithm runs, a total of 100,000 genetic operations were carried out on five islands, each containing

100 individuals. The niche size was set to 2, and the value for the selection pressure was set to 1.1. Genetic operator weights for crossover, mutation, and migration were set to 95, 95, and 10, respectively. The scoring function used to rank the dockings was Goldscore. The outputs were analyzed with MacPyMOL and VMD.

Results and discussion

Cloning and sequence analysis

We cloned the full-length cDNA of an elongase from the European perch. PCR with specific primers (Table 1) resulted in the amplification of a 885-base pair Open Reading Frame coding for a 294-amino acid protein (GenBank accession no. KR360724), with a calculated MW and a pI of 35 kD and 9, respectively. Phylogenetic analysis (Fig. 1) compares fish elongases and sets the perch sequence close to other Perciformes (*Sparus aurata* and *Epinephelus coioides*) and within the marine teleost ELOVL (*Nibea mitsukurii*, *Argyrosomus regius*, *Dicentrarchus labrax*, *Siganus canaliculatus*, *Scophthalmus maximus*, etc.). More generally, *pfELOVL* clusters within the ELOVL5 sub-group of the ELOVL2/5 group, distinct from its ELOVL4 and ELOVL1/6/7 counterparts. A BLASTp analysis on the translated amino-acid sequence indicates that *pfELOVL* shows 90%, 89%, 78%, and 73% identity with *Lates calcarifer*, *Epinephelus coioides*, *Salmo salar*, and *Danio rerio* ELOVL5, respectively, and 77% with *Oncorhynchus mykiss* ELOVL2. Regarding the independent evolution of the different ELOVL elongase sub-families amongst biological lineage (Xue et al. 2014), and considering *pfELOVL* clustered within ELOVL5 sub-group, it is most likely our protein belongs to this one. A functional study in heterologous system would definitely confirm this hypothesis.

Moreover, amino-acid sequence alignment with fish elongases (ELOVL2/5 and ELOVL4 groups) from freshwater (*Oreochromis niloticus*, *O. mykiss*, and *D. rerio*),

marine (*S. aurata* and *Rachycentron canadum*), and anadromous species (*S. salar*) confirms that *pfELOVL* includes all the characteristics of elongases: several TMH (N³¹...K⁵¹, L⁶⁵...T⁸⁵, I¹⁰⁹...F¹²⁹, F¹⁴¹...V¹⁶¹, G¹⁶⁹...I¹⁸⁹, Y²⁰¹...A²²¹ and K²²⁹...F²⁴⁹), an ER retention signal (K²⁸⁹KLR²⁹²) and the four “conserved boxes” (KEDT-box, K¹²⁰LIEFMDT¹²⁷; His-box, Q¹³⁸MTFLHIYHH¹⁴⁷; Tyr-box, N¹⁷³SFVHVVMYSY¹⁸⁴; and Gln-box, T²⁰³QLQLIQ²⁰⁹) (Fig. 2).

2D structural patterns

In our *pfELOVL*-5 model, 113 residues are involved in α helix (38.44%), 52 in β sheet (17.69%), 120 in random coil (40.82%), and 9 (3.06%) are not assigned. Globally, this result corroborates a higher proportion of α secondary structure than a β one, in accordance with the literature for the elongase family (Leonard et al. 2004; Tvrdik et al. 2000).

Furthermore, we found an endoplasmic reticulum retention signal (K²⁸⁹Kxx²⁹²) and the protein is predicted to be addressed in the ER, data confirmed by the literature (Jakobsson et al. 2006). However, we could not find any signal peptide. Nonetheless, for proteins with multiple α helices, it is known membrane addressing can be directed by an N-terminal “hydrophobic signal” corresponding to one of the two first α helices inserted in the membrane (Monné et al. 2005). We predict this is the case for the ELOVL family.

In addition, the majority (12 of 15) of the secondary structure prediction tools (Table 1) have also shown seven TMH, also in agreement with the literature, which commonly admits between 5 and 7 α helices (Fig. 3). Furthermore, the orientation of the loop elements is supported by experimental data regarding the localisation of the putative catalytic site: precursor synthesis in the cytosol, cofactors localisation on the ER cytoplasmic face, and proof of an enzyme activity inhibition outside the ER (Monné et al. 1999, 2005; DePierre and Ernster 1977).

Table 1 Sequence and melting temperature of degenerate and gene-specific primers

PCR	Primers	Primer sequences	T_m (°C)
Degenerated PCR	Elovl-deg-F1	5'-YVCTDTGGTGGTAYTAYTTCTC-3'	46.0
	Elovl-deg-R1	5'-TRTANGTCTKWATGTAGAAGTT-3'	42.3
5'-RACE-PCR	Elo-5'-R1	5'-TAGAAGGACAAGACTGTGAGGCCAGATTGT-3'	58.0
	Elo-5'-R2	5'-TACGGCTGCCTGTGTTTCATGTACTTG-3'	54.6
	Elo-5'-R3	5'-TAGTTGTCGAGCAGCAGCCATCCCTG-3'	57.6
3'-RACE-PCR	Elo-3'-F1	5'-CAGCTTCGTCCACGTTGTGATGTATTC-3'	54.6
	Elo-3'-F2	5'-GAAGAAGTACATCACACAGTTACAGCTGA-3'	53.6
	Elo-3'-F3	5'-AAGGGATGGCTGTACTCCCAACAAG-3'	54.4
FL-PCR	Elvol5-dig-F	5'-CCCAAGCTTATGGAGACCTTTAATCATAA-3'	52.2
	Elvol5-dig-R	5'-GCGGGATCCTCAATCCACCCTCAGTTTCT-3'	59.3

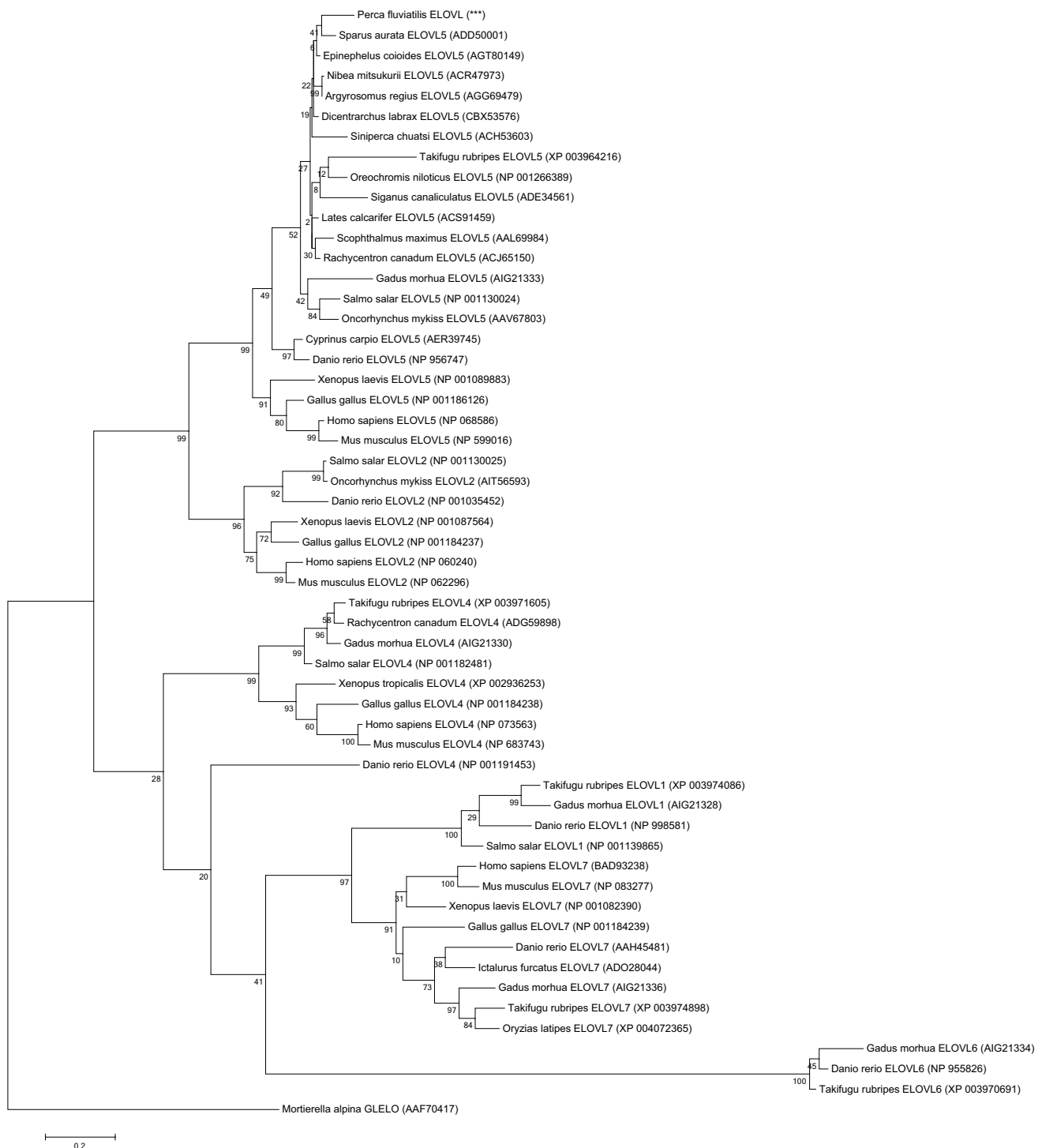


Fig. 1 Phylogenetic relationship of *Perca fluviatilis* ELOVL with elongase proteins from other organisms

3D structure model embedded in an artificial membrane

As no ELOVL homologues structure is available in the PDB to perform homology modelling, a 3D model was set up using the de novo method Rosetta, which is well

known for efficiently modelling membrane proteins (Das and Baker 2008). Based on (1) the determined amino-acid sequence, (2) the 7 TMH topology, (3) the calculated lipophilicity profile, and (4) a template identified by a fold-recognition method (RaptorX), i.e., the NADH-CoQ reductase/NADH dehydrogenase from *Escherichia coli*

[illegible]

Fig. 2 Alignment of the elongase amino-acid sequence from European Perch with fish orthologs. The GenBank accession numbers of the aligned amino-acid sequence areas follows: *Sparus aurata* (ADD50001), *Oreochromis niloticus* (NP_001266389), *Salmo salar* (NP_001130024), *Oncorhynchus mykiss* (NM_001124636), *Danio*

erio (NP_956747), *Rachycentron canadum* (ADG59898.1). The ER retention motif is coloured in grey, the TMH in blue (underlined when overlapping with conserved boxes), and the conserved boxes in red. * sequence identity, : conservative substitution, . semi-conservative substitution

(3RKO, 3.0 Å resolution), we have obtained a valid model of the structure. Indeed, Ramachandran plots support the quality of the simulated model (more than 99% of favoured or allowed region) (Fig. 4). Geometrical constraints were

applied to the structure to conserve a minimal distance between residues in the four conserved boxes (with 5 Å).

As *pfELOVL5* is a membrane protein, the modelled structure was embedded in an artificial lipid bilayer mimicking

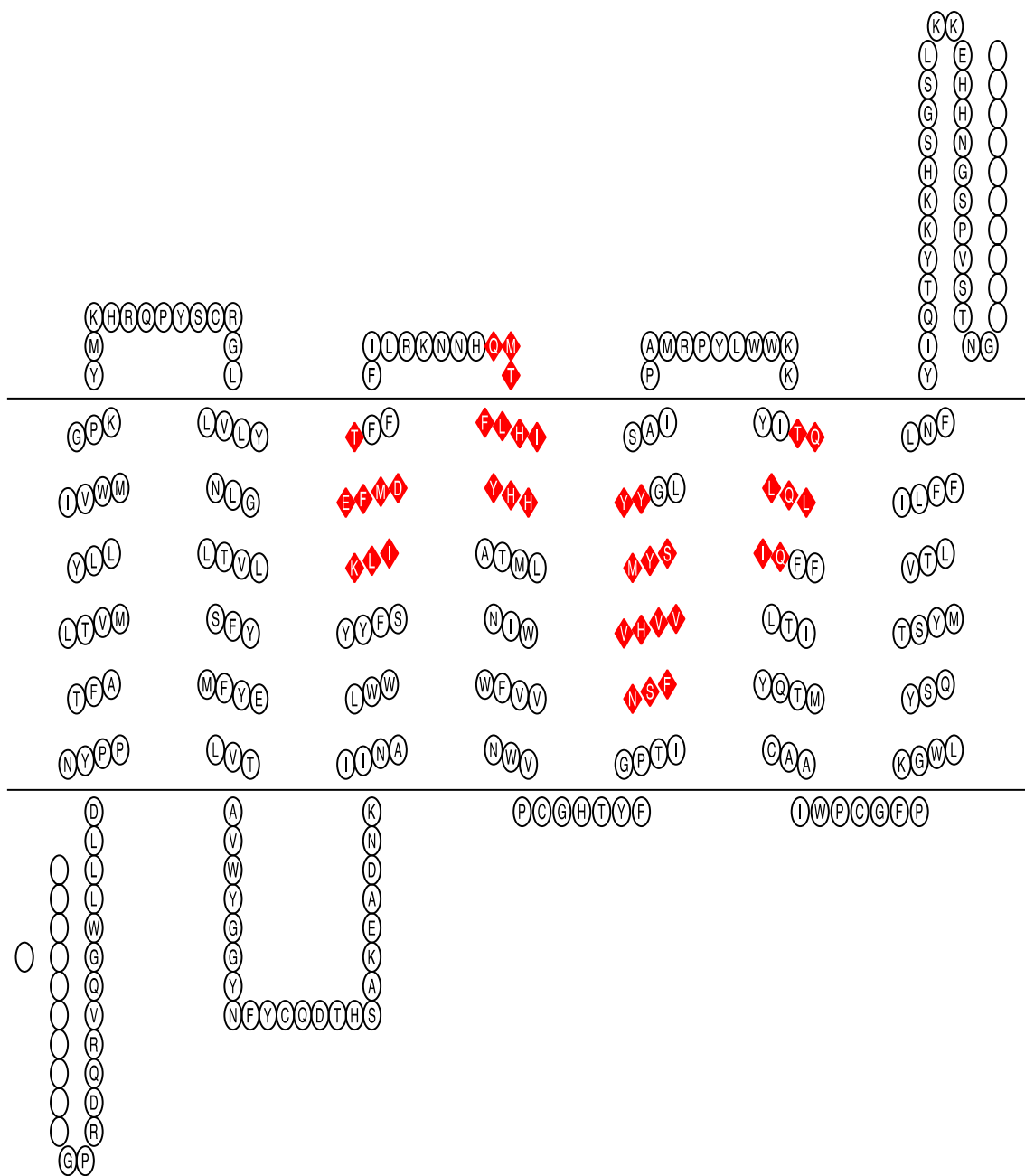
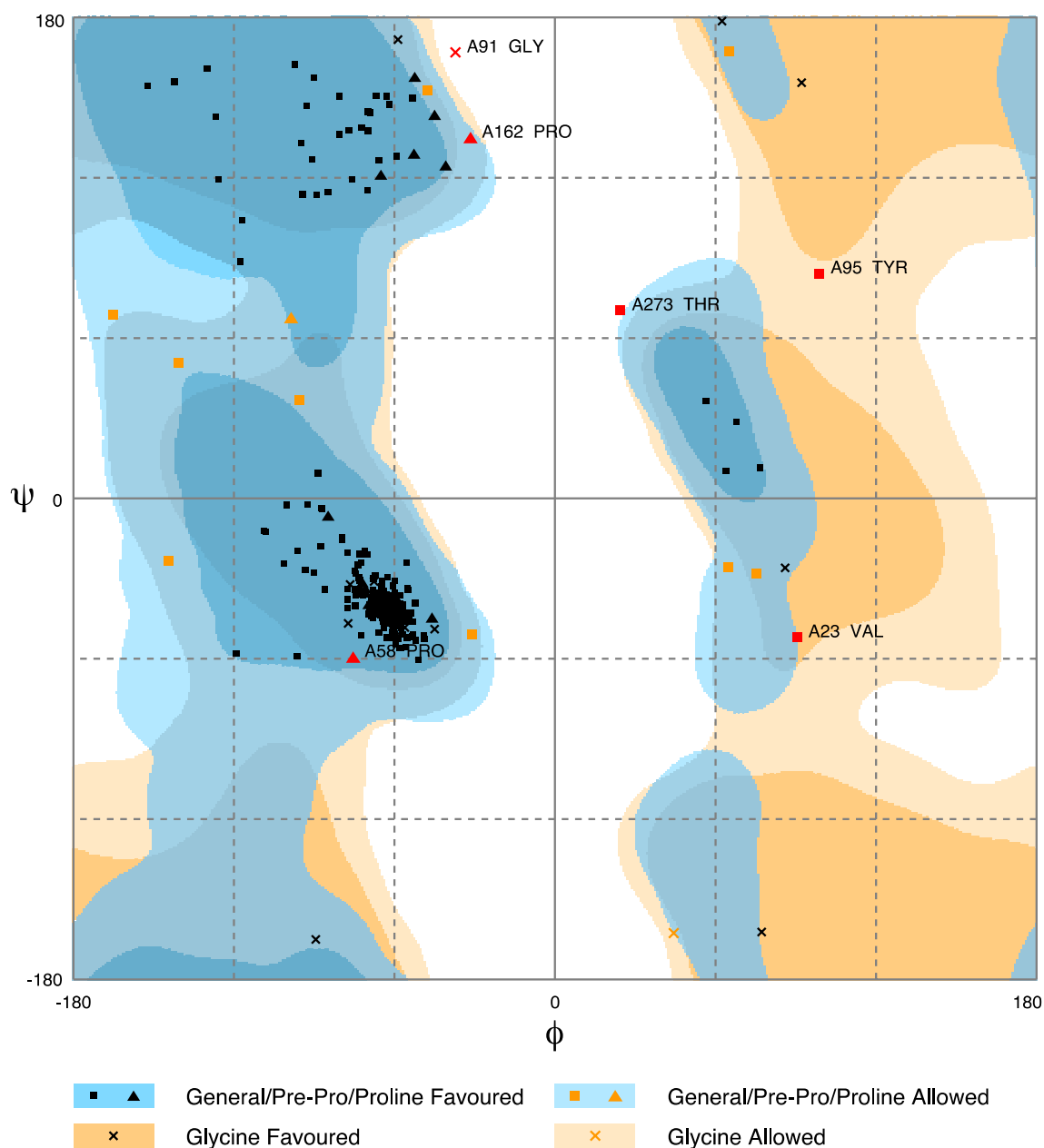


Fig. 3 2D theoretical model of *pELOVL5* (<http://www.sacs.ucsf.edu/cgi-bin/open-topo2.py/>) inserted in ER membrane with the cytosol above and lumen side below. The four conserved boxes are coloured in red and the ER retention signal in purple

the natural environment of the protein. The overall structure was then refined using MD (Fig. 5a, b). A 1-stearoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-phosphocholine (SLPC, C18:0/C18:2) lipid bilayer was selected, because phosphatidylcholine represents more than 50% of the ER lipid content in eukaryotes (OPM database). In addition, its linoleic acid residue (C18:2 Δ 9,12) is closely related to GLA (C18:3 Δ 6,9,12), an ELOVL5 substrate. Moreover, linoleic acid is a direct substrate of ELOVL5 in the Δ 8 desaturase alternative pathway (Fonseca-Madriral et al. 2014; Monroig et al. 2011b, 2013b; Tu et al.

2012b). The time evolution of Root Mean Square Deviation (RMSD) of the protein backbone atoms is analyzed to check the stability of the system. At the end of the simulation, the RMSD is almost steady, attesting the system's stabilization (Fig. 6a). Focusing on the flexible regions of the protein, the Root Mean Square Fluctuation (RMSF) plot was generated with respect to individual residues (Fig. 6b). The residues involved in loops and, therefore, more exposed to the solvent, show greater fluctuations, the C-terminal end not bound to the membrane being the most flexible. Regarding



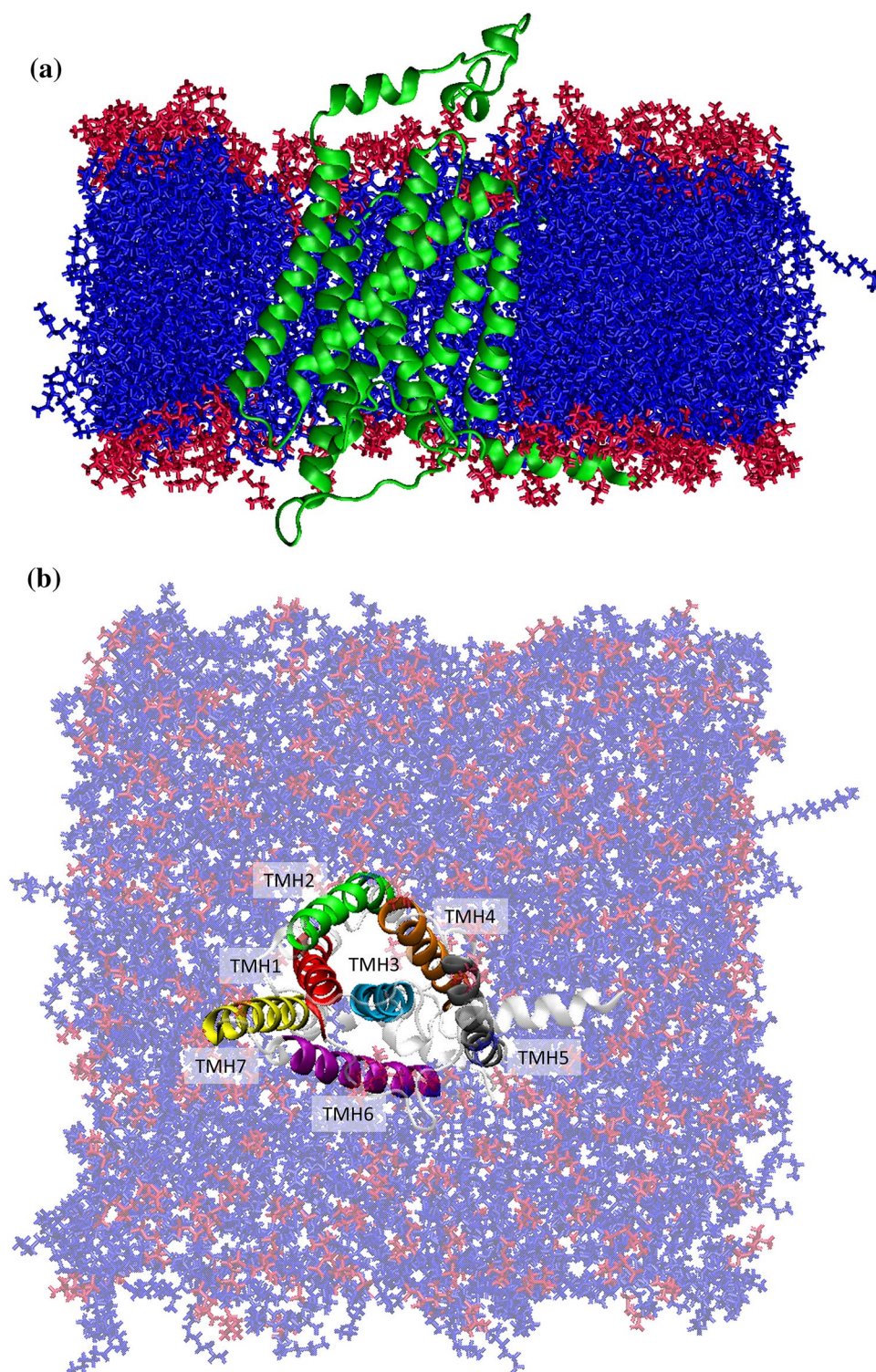
Number of residues in favoured region (~98.0% expected) : 239 (93.4%)
 Number of residues in allowed region (~2.0% expected) : 11 (4.3%)
 Number of residues in outlier region : 6 (2.3%)

RAMPAGE by Paul de Bakker and Simon Lovell available at <http://www-cryst.bioc.cam.ac.uk/rampage/>

Please cite: S.C. Lovell, I.W. Davis, W.B. Arendall III, P.I.W. de Bakker, J.M. Word, M.G. Prisant, J.S. Richardson & D.C. Richardson (2002) Structure validation by C α geometry: ϕ/ψ and C β deviation. *Proteins: Structure, Function & Genetics*. **50**: 437-450

Fig. 4 Ramachandran plot of the model of *pELOVL5*

Fig. 5 Our *pf*ELOVL5 model in SLPC bilayer. **a** Side view; **b** top view



the secondary structural content, each motif remains stable during the simulation, with a content of 60–70% α -helix and no β -sheet/bridge/bulge (Fig. 7a). Finally, the radius of gyration (R_g) reflecting the compactness of *pf*ELOVL5 is stable over the time, and ranges from 2.25 to 2.45 nm (Fig. 7b). All these analyses demonstrate the robustness of our model.

Identification of a potential catalytic site

From our reliable 3D model embedded in membrane, a molecular docking analysis with two key substrates (GLA and ARA) was performed to identify essential residues involved in the formation of the enzyme–substrate complex,

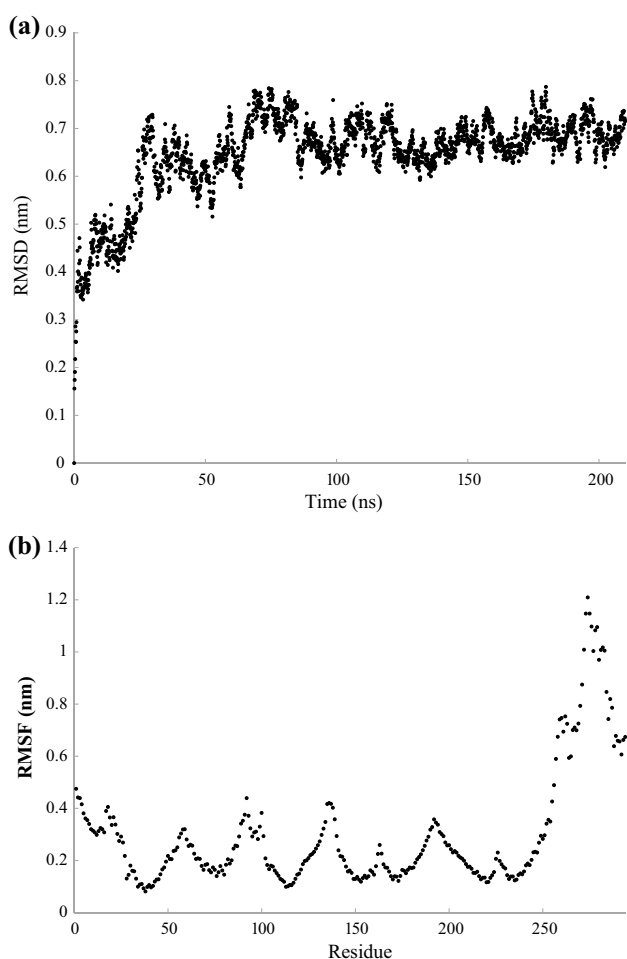


Fig. 6 **a** Evolution of C α RMSD during the MD simulation, **b** RMSF of C α averaged over all subunits from the last 1 ns

an essential step to understand the mechanism of action of elongation.

Two binding modes of GLA have been identified (Fig. 8a, b). In the first one, called “I”, three types of molecular interactions are involved: a strong electrostatic interaction between K¹²⁰ and –COO[–], two H bonds between –COO[–], and the K¹²⁰ and H¹⁷⁷, and a CH– π interaction (Takahashi et al. 2010) between the ligand alkyl chain and the indole group of W¹¹⁴ (Fig. 8a). K¹²⁰ and H¹⁷⁷ are part of the KEDT- and Tyr-box, respectively. The alkyl chain is close to hydrophobic and aromatic amino acids: L²⁸, W²⁶, L¹¹³, Y¹¹⁷, V¹⁷⁶, and L²¹².

In the second one, called “II”, K¹²⁰ is also involved in an electrostatic interaction with –COO[–], while three H bonds between the ligand carboxylate group and Y¹¹⁷, Y¹⁸⁴, and Q²⁰⁹ are also observed (Fig. 8b). Q²⁰⁹ and Y¹⁸⁴ are in the Gln- and Tyr-box, respectively. The alkyl chain is surrounded by several hydrophobic residues such as L²⁸, A¹⁰⁵, I¹¹⁰, L¹¹³, V¹⁷⁶, and W¹¹⁴. For ARA, the mode II seems the preferential-binding mode with two H bonds observed

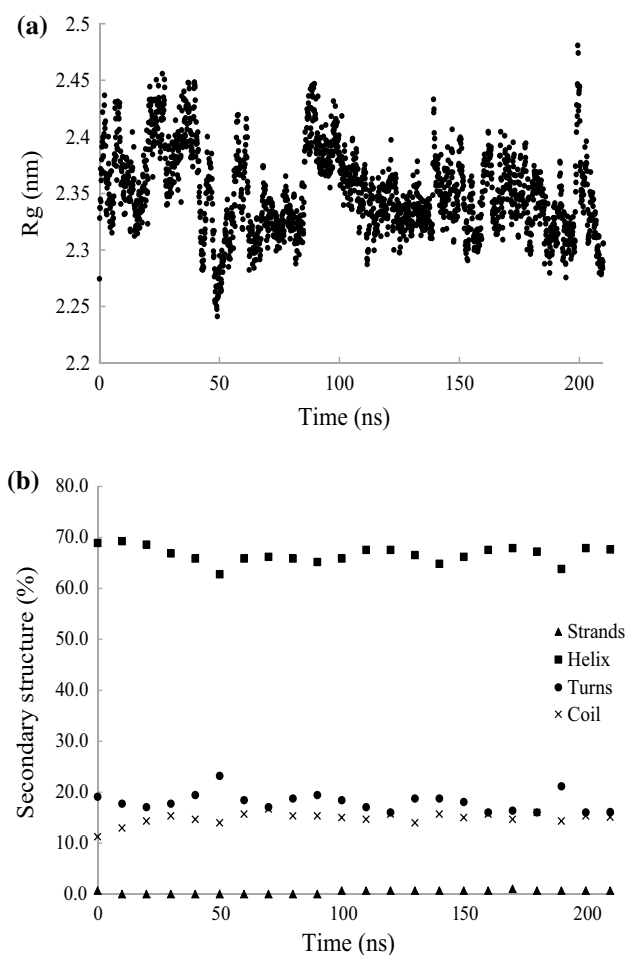


Fig. 7 **a** Rg plot of *pfELOVL5* during MD simulation, **b** secondary structure % as a function of time

between the carboxylate moiety and Y¹¹⁷ and H¹⁷⁷ (data not shown).

At this point, it is difficult to decide for one or other mode but these studies already highlight potential essential amino acids present in both binding modes, i.e., K¹²⁰, H¹⁷⁷, and W¹¹⁴. Interestingly, amongst them, K¹²⁰ and H¹⁷⁷ are absolutely conserved along fatty-acid elongases (Carmona-Antoñanzas et al. 2013). This contribution, presenting the model of an ELOVL from the European perch, a carnivorous freshwater fish and prime candidate for the diversification of European aquaculture, paves the way to better understanding of the substrate specificities of this enzyme family and the potential mechanisms of fatty-acid elongation.

Conclusion

In this study, we isolated and cloned the coding sequence of a very long-chain fatty-acid ELOVL5-like elongase from a freshwater fish, the European perch (*P. fluviatilis*).

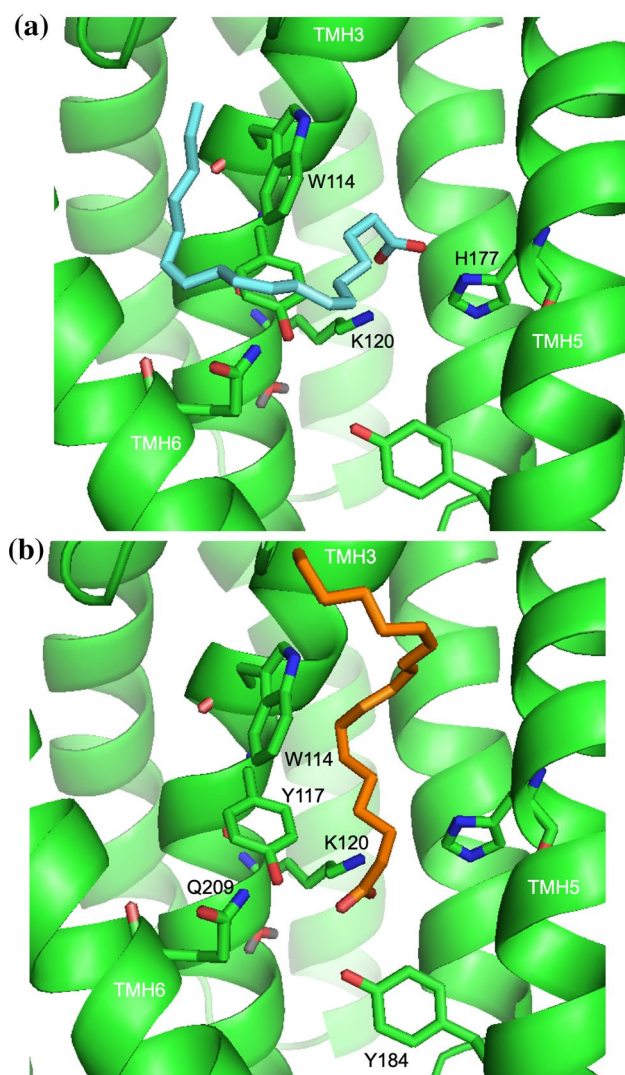


Fig. 8 Molecular docking of GLA on *p/ELOVL5*. **a** Mode I, **b** mode II

Sequencing results from genetics experiments allowed to predict a 3D model structure embedded in an ER-like artificial membrane, used to provide two putative substrate-binding modes and highlight essential amino acids. Assume to belong to ELOVL5 sub-group of the ELOVL2/5 sub-family, it remains necessary to perform a functional study in heterologous system to confirm this hypothesis. Otherwise, our modelling studies give key structural data on a carnivorous teleost elongase belonging to an important protein family for human and animal nutrition.

Acknowledgements This work was supported by funding from the Belgian National Fund for Scientific Research (F.R.S.-FNRS) through a postdoctoral fellowship to F. Geay (FRFC project no. 6.8073.70) and a PhD fellowship to E. Tinti (FRIA project no. FC89770), and from the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca de Catalunya through a PhD fellowship to M. Lopes Rodrigues. C. Michaux

and E. A. Perpète thank the F.R.S.-FNRS for their Research Associate and Senior Research Associate position, respectively. This research used resources of the Platform High Performance Computing (PTCI) located at the University of Namur, Belgium, which is supported by the F.R.S.-FNRS (project no. 2.5020.11). The PTCI is member of the "Consortium des Équipements de Calcul Intensif (CÉCI)".

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Abraham MJ et al (2015) GROMACS: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* 1–2:19–25
- Berendsen HJC, van der Spoel D, van Drunen R (1995) GROMACS: a message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Comput Phys Commun* 91:43–56
- Blacklock BJ, Kelley D, Patel S (2008) A fatty acid elongase ELO with novel activity from *Dictyostelium discoideum*. *Biochem Biophys Res Commun* 374:226–230
- Calder PC (2014) Very long chain omega-3 (n-3) fatty acids and human health. *Eur J Lipid Sci Technol* 116:1280–1300
- Carmona-Antoñanzas G et al (2011) Biosynthesis of very long-chain fatty acids (C > 24) in Atlantic salmon: cloning, functional characterisation, and tissue distribution of an Elovl4 elongase. *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol* 159:122–129
- Carmona-Antoñanzas G et al (2013) An evolutionary perspective on Elovl5 fatty acid elongase: comparison of Northern pike and duplicated paralogs from Atlantic salmon. *BMC Evol Biol* 13:85–97
- Das R, Baker D (2008) Macromolecular modeling with Rosetta. *Annu Rev Biochem* 77:363–382
- Denic V, Weissman JS (2007) A molecular caliper mechanism for determining very long-chain fatty acid length. *Cell* 130:663–677
- DePierre JW, Ernster L (1977) Enzyme topology of intracellular membranes. *Annu Rev Biochem* 46:201–262
- D'Odorico P et al (2014) Feeding humanity through global food trade. *Earth's Future* 2:458–469
- Essmann U et al (1995) A smooth particle mesh Ewald method. *J Chem Phys* 103:8577–8593
- Fonseca-Madrigal J et al (2014) Diversification of substrate specificities in teleostei Fads2: characterization of D4 and D6D5 desaturases of *Chirostoma estor*. *J Lipid Res* 55:1408–1419
- Geay F et al (2015a) Effects of dietary linseed oil on innate immune system of Eurasian perch and disease resistance after exposure to *Aeromonas salmonicida* achromogen. *Fish Shellfish Immunol* 47:782–796
- Geay F et al (2015b) Dietary linseed oil reduces growth while differentially impacting LC-PUFA synthesis and accretion into tissues in Eurasian Perch (*Perca fluviatilis*). *Lipids* 50:1219–1232
- Geay F et al (2016) Cloning and functional characterization of $\Delta 6$ fatty acid desaturase (FADS2) in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol* 191:112–125
- Godfray HCJ et al (2010) Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science* 327:812–818
- Graziano da Silva J (2014) The State of World Fisheries and Aquaculture 2014. FAO, Rome
- Gregory MK, James MJ (2014) Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Elovl5 and Elovl2 differ in selectivity for elongation

- of omega-3 docosapentaenoic acid. *BBA Mol Cell Biol Lipids* 1841:1656–1660
- Henrotte E et al (2011) n-3 and n-6 fatty acid bioconversion abilities in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) at two developmental stages. *Aquac Nutr* 17:e216–e225
- Hernandez-Buquer S, Blacklock BJ (2013) Site-directed mutagenesis of a fatty acid elongase ELO-like condensing enzyme. *FEBS Lett* 587:3837–3842
- Hess B et al (1997) LINCOS: a linear constraint solver for molecular simulations. *J Comput Chem* 18:1463–1472
- Huang J, Mackerell AD Jr (2013) CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data. *J Comput Chem* 34:2135–2145
- Humphrey W, Dalke A, Schulten K (1996) VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 14:33–38
- Jakobsson A, Westerberg R, Jacobsson A (2006) Fatty acid elongases in mammals: their regulation and roles in metabolism. *Prog Lipid Res* 45:237–249
- Kabsch W, Sander C (1983) Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* 22:2577–2637
- Kihara A (2012) Very long-chain fatty acids: elongation, physiology and related disorders. *J Biochem* 152:387–395
- Kuah MK, Jaya-Ram A, Shu-Chien AC (2015) The capacity for long-chain polyunsaturated fatty acid synthesis in a carnivorous vertebrate: functional characterisation and nutritional regulation of a Fads2 fatty acyl desaturase with $\Delta 4$ activity and an Elovl5 elongase in striped snakehead (*Channa striata*). *Biochim Biophys Acta* 1851:248–260
- Lee J et al (2016) CHARMM-GUI input generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM simulations using the CHARMM36 additive force field. *J Chem Theory Comput* 12:405–413
- Lenihan-Geels G, Bishop KS, Ferguson LR (2013) Alternative sources of omega-3 fats: can we find a sustainable substitute for fish? *Nutrients* 5:1301–1315
- Leonard AE et al (2004) Elongation of long-chain fatty acids. *Prog Lipid Res* 43:36–54
- Logan S et al (2014) Endoplasmic reticulum microenvironment and conserved histidines govern ELOVL4 fatty acid elongase activity. *J Lipid Res* 55:698–708
- Mohd-Yusof NY et al (2010) Investigation of highly unsaturated fatty acid metabolism in the Asian sea bass, *Lates calcarifer*. *Fish Physiol Biochem* 36:827–843
- Monné M et al (1999) N-Tail translocation in a eukaryotic polytopic membrane protein. Synergy between neighboring transmembrane segments. *Eur J Biochem* 263:264–269
- Monné M et al (2005) Competition between neighboring topogenic signals during membrane protein insertion into the ER. *FEBS J* 272:28–36
- Monroig O et al (2010) Expression and role of Elovl4 elongases in biosynthesis of very long-chain fatty acids during zebrafish *Danio rerio* early embryonic development. *Biochim Biophys Acta* 1801:1145–1154
- Monroig Ó et al (2011a) Biosynthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids in marine fish: characterization of an Elovl4-like elongase from cobia *Rachycentron canadum* and activation of the pathway during early life stages. *Aquaculture* 312:145–153
- Monroig O, Li Y, Tocher DR (2011b) Delta-8 desaturation activity varies among fatty acyl desaturases of teleost fish: high activity in delta-6 desaturases of marine species. *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol* 159:206–213
- Monroig Ó et al (2013a) Functional characterisation of a Fads2 fatty acyl desaturase with $\Delta 6/\Delta 8$ activity and an Elovl5 with C16, C18 and C20 elongase activity in the anadromous teleost meagre (*Argyrosomus regius*). *Aquaculture* 412:14–22
- Monroig Ó, Tocher DR, Navarro JC (2013b) Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in marine invertebrates: recent advances in molecular mechanisms. *Mar Drugs* 11:3998–4018
- Monroig Ó et al (2016) Evolutionary functional elaboration of the Elovl2/5 gene family in chordates. *Sci Rep* 6:1–10
- Morais S et al (2009) Highly unsaturated fatty acid synthesis in Atlantic salmon: characterization of ELOVL5- and ELOVL2-like elongases. *Mar Biotechnol* 11:627–639
- Morais S et al (2011) Expression of fatty acyl desaturase and elongase genes, and evolution of DHA:EPA ratio during development of unfed larvae of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L.). *Aquaculture* 313:129–139
- Morais S et al (2012) Long chain polyunsaturated fatty acid synthesis in a marine vertebrate: ontogenetic and nutritional regulation of a fatty acyl desaturase with $\Delta 4$ activity. *Biochim Biophys Acta* 1821:660–671
- Nayak S et al (2017) Dietary arachidonic acid affects immune function and fatty acid composition in cultured rabbitfish *Siganus rivulatus*. *Fish Shellfish Immunol* 68:46–53
- Nayak M et al (2018) Molecular characterization, tissue distribution and differential nutritional regulation of putative Elovl5 elongase in silver barb (*Puntius gonionotus*). *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol* 217:27–39
- Parrinello M, Rahman A (1981) Polymorphic transitions in single crystals: a new molecular dynamics method. *J Appl Phys* 52:7182–7190
- Ren H, Yu J, Xu P, Tang Y (2012) Influence of dietary fatty acids on muscle fatty acid composition and expression levels of D6 desaturase-like and Elovl5-like elongase in common carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol* 163:184–192
- Russell FD, Bürgin-Maunders CS (2012) Distinguishing health benefits of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *Mar Drugs* 10:2535–2559
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406–425
- Steenfeldt S et al (2015) Current status of Eurasian percid fishes aquaculture. In: Kestemont P, Dabrowski K, Summerfelt RC (eds) *Biology and culture of percid fishes*. Springer, Dordrecht, pp 817–841
- Strobel C, Jahreis G, Kuhnt K (2012) Survey of n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids in fish and fish products. *Lipids Health Dis* 11:144
- Tacon AGJ et al (2012) Aquaculture feeds: addressing the long-term sustainability of the sector. In: *Farming waters people food. Proceedings of the global conference on aquaculture 2010*, FAO/NACA, Thailand & Rome, pp 193–231
- Takahashi O, Kohno Y, Nishio M (2010) Relevance of weak hydrogen bonds in the conformation of organic compounds and bioconjugates: evidence from recent experimental data and high-level ab initio MO calculations. *Chem Rev* 110:6049–6076
- Tan SH, Chung HH, Shu-Chien AC (2010) Distinct developmental expression of two elongase family members in zebrafish. *Biochem Biophys Res Commun* 393:397–403
- Tocher DR (2015) Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids and aquaculture in perspective. *Aquaculture* 449:94–107
- Tu WC et al (2012a) An alternative n-3 fatty acid elongation pathway utilising 18:3n-3 in barramundi (*Lates calcarifer*). *Biochem Biophys Res Commun* 423:176–182
- Tu WC et al (2012b) Barramundi (*Lates calcarifer*) desaturase with $\Delta 6/\Delta 8$ dual activities. *Biotechnol Lett* 34:1283–1296
- Tvrđik P et al (2000) Role of a new mammalian gene family in the biosynthesis of very long chain fatty acids and sphingolipids. *J Cell Biol* 149:707–717
- Vrinten PL, Hoffman T, Bauer J, Qiu X (2010) Specific protein regions influence substrate specificity and product length in

- polyunsaturated fatty acid condensing enzymes. *Biochemistry* 49:3879–3886
- Walls J, Sinclair L, Finlay D (2016) Nutrient sensing, signal transduction and immune responses. *Semin Immunol* 28:396–407
- Wang S et al (2014) Investigating long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis in teleost fish: functional characterization of fatty acyl desaturase (Fads2) and Elovl5 elongase in the catadromous species, Japanese eel *Anguilla japonica*. *Aquaculture* 434:57–65
- Xue X et al (2014) Characterization of the fatty acyl elongase (elovl) gene family, and hepatic elovl and delta-6 fatty acyl desaturase transcript expression and fatty acid responses to diets containing camelina oil in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol* 175:9–22
- Yeagle PL (2014) *Lipids*. Wiley, New York, pp 1–9

